



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM OVINOS

THIAGO ANTONIO DE SOUZA NASCIMENTO SILVA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM OVINOS**

Aluno: Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

CO-ORIENTADOR: Dr. Alexandre Floriani Ramos

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 121D/2014

BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2014

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, T.A.S.N. Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 102 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas desde que citadas às fontes.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, T.A.S.N. **Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 102 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2014.

1. Plasma seminal. 2. Sêmen. 3. Proteína. 4. Congelabilidade. 5. Ovino I. Neves, Jairo Pereira, orientador. II. Ramos, Alexandre Floriani, co-orientador. III. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM OVINOS**

THIAGO ANTONIO DE SOUZA NASCIMENTO SILVA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

JAIRO PEREIRA NEVES, Doutor (UnB)

RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, Doutor (UnB)

IVO PIVATO, Doutor (UnB)

MARILÍA VIVIANE SNEL DE OLIVEIRA, Doutora (UPIS)

FABIANA CRISTINA VARAGO, Doutora (UNIFENAS)

BRASÍLIA/DF, 27 de Novembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (Zé e Zelia) pelo amor, oportunidade, carinho, apoio e conforto em todos os momentos, pelos ensinamentos e lições de vida tenho a mais profunda admiração e respeito. Obrigado por serem meus pais.

A minha amada esposa Bianca Damiani, minha princesa Julia Damiani e meu pequeno príncipe Pedro Antonio, fonte de carinho, alegria, vida e amor. Agradeço todos os dias a Deus por te me dado à chance de estar ao lado de vocês. Vocês e meus pais são a razão da minha vida

Ao Mestre Jairo Pereira Neves, orientador e amigo, homem sábio e exemplo a ser seguido, minha gratidão é imensa, pela confiança e orientação em todas as etapas que estivemos juntos “ o mestre e o aluno caminham lado a lado e nunca se separam, mesmo longe um do outro estão sempre juntos no coração é na alma”. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por estar ao meu lado guiando meus passos, e que me dá saúde, força de vontade e alegria de viver cada vez mais;

Aos meus familiares, especialmente minha irmã Lucia de Fatima;

Ao meu co-orientador Dr. Alexandre Floriani Ramos, pela amizade e oportunidade de trabalharmos juntos. Pela compreensão e ajuda nessa caminhada.

A pesquisadora da EMBRAPA Dra. Angela Mehta pela grande oportunidade de aprendizado. Obrigado pela possibilidade de conhecer este novo mundo da proteômica, pela compreensão e ajuda durante toda esta fase.

Aos pesquisadores Dr. Mauricio Franco e Dra. Margot Dode, pela atenção e colaboração na realização desse experimento.

Ao amigo Chico, pela ajuda e dedicação nas atividades do projeto. Pela grande amizade contruída nessa caminhada. Obrigado.

A Lilian Travassos, pelos ensinamentos, dedicação e companheirismo nas atividades com a proteômica. Obrigado.

A Paula Souto, pelo apoio no auxílio da estatística.

Aos colegas da EMBRAPA, alunos de doutorado, mestrado e estagiários, a todos vocês um grande abraço;

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, especialmente aos funcionários do Campo Experimental Sucupira. Em especial ao funcionário Normandes pelo apoio;

Aos criadores de ovinos Rogerio Tokarski, Arimateia Torres, Israel Torres por acreditarem em nosso trabalho, amizade e por terem cedido os animais.

Em especial a Celia Maria Mendes de Carvalho e Rimarck de Carvalho pela amizade construída através dos ovinos. Obrigado pelo carinho, atenção e pela sincera amizade que persistira pela vida toda;

Ao amigo Andre Triacca, pela grande e verdadeira amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Animais pela oportunidade.

A CAPES e CNPq pela bolsa de estudo;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que contribuíram e torceram por mim.

ÍNDICE

Capítulos/Sub-capítulos

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xviii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivos.....	4
1.1.1 Geral.....	4
1.1.2 Específicos.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Criopreservação do Sêmen e seus Danos à Célula.....	6
2.2 Plasma Seminal	9
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE	
CARNEIROS DE ALTA E BAIXA CONGELABILIDADE.....	20
1 RESUMO.....	21
2 ABSTRACT.....	23
3 INTRODUÇÃO.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Delineamento Experimental.....	26
4.2 Coleta e Avaliação de Sêmen.....	27
4.2.1 Integridade de Membrana.....	27
4.2.2 Integridade de Acrossoma.....	27
4.2.3 Criopreservação de Sêmen.....	28
4.4.4 Descongelção de Sêmen e Teste de Termo Resistência.....	28
4.2.5 Avaliação de Sêmen Descongelado.....	29

4.2.6	Avaliação da Cinética Espermática.....	29
4.2.7	Avaliação da Fertilidade.....	29
4.2.8	Amostras de Plasma Seminal para Análise Proteômica.....	30
4.2.9	Análise de Proteínas por Eletroforese Bidimensional.....	30
4.2.10	Análise de Imagem.....	31
4.2.11	Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massa.....	31
4.3	Análise Estatística.....	32
5	RESULTADOS.....	33
5.1	Avaliações do Sêmen dos Carneiros Quanto à Resistência à Criopreservação.....	33
5.2	Determinação do Perfil Proteico de Animais Contrastantes Quanto à Resistência a Criopreservação.....	35
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONCLUSÃO.....	44
8	AGRADECIMENTOS.....	45
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 3 – A ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS DE ALTA CONGELABILIDADE DE SÊMEN MELHORA A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA DE CARNEIROS DE BAIXA CONGELABILIDADE DE SÊMEN.....		
1	RESUMO.....	54
2	ABSTRACT.....	55
3	INTRODUÇÃO.....	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1	Delineamento Experimental.....	58
4.2	Coleta e Avaliação de Sêmen.....	60
4.2.1	Avaliação do Sêmen Fresco.....	61
4.2.2	Criopreservação de Sêmen.....	61
4.2.3	Avaliação do Sêmen Descongelado.....	60
4.3	Análise Estatística.....	62
5	RESULTADOS.....	63
5.1	Experimento 1. Método de Adição do Plasma Seminal ao Sêmen Após a Coleta.....	63

5.2 Experimento 2. Efeito da Concentração de Plasma Seminal Adicionado ao Sêmen Logo Após a Coleta.....	64
5.3 Experimento 3. Efeito da Adição de Plasma Seminal de Reprodutores Inteiros e Vasectomizados ao Sêmen Após a Coleta.....	66
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÃO.....	72
8 AGRADECIMENTOS.....	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM OVINOS

MSc. Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva

Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Brasília, DF

RESUMO

A qualidade do sêmen é influenciada por diversos fatores tais como os inerentes aos indivíduos, a frequência de coletas, o meio ambiente, a estação do ano, a temperatura, precipitação pluviométrica. Interferindo, diretamente, na qualidade das amostras criopreservadas com reflexos diretos nos índices de concepção das fêmeas inseminadas. Estudos têm demonstrado que o plasma seminal pode favorecer a viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática, motilidade e a fertilidade do sêmen ovino criopreservado. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de carneiros com diferentes níveis de congelabilidade de sêmen e o efeito da adição de plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade de sêmen no sêmen de carneiros de baixa congelabilidade de sêmen antes da criopreservação. No capítulo 2 observou-se uma superioridade ($P < 0,05$) do carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen em relação ao carneiro 18 de baixa congelabilidade de sêmen após a descongelação e teste de termo resistência (TTR), baseado nos parâmetros de motilidade, integridade de membrana e integridade de acrossoma. Na avaliação do sêmen fresco não foi

observada diferença ($P>0,05$) em nenhum dos parâmetros analisados entre os dois carneiros. Da mesma forma para a avaliação da fertilidade em monta natural não houve diferença ($P>0,05$) entre os dois carneiros. Selecionados os carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen foram caracterizados os perfis proteicos do plasma seminal dos mesmos, determinado por eletroforese bidimensional e a identificação das proteínas foi realizada por espectrometria de massa. Com um total de 23 *spots* foram identificadas com sucesso. Proteínas como RSVP14, RSVP20, clusterina, glutathiona peroxidase, albumina e lipocalina foram exclusivas ou mais expressas no carneiro de alta congelabilidade. Proteínas como as espermedesina Z13, bodesina 2 foram mais expressas no carneiro de baixa congelabilidade. Essas proteínas se apresentam como potenciais marcadores para qualidade do sêmen criopreservado. No capítulo 3 com o objetivo de avaliar a adição do plasma seminal de carneiro de alta congelabilidade no sêmen de carneiros de baixa congelabilidade antes da criopreservação, observou que a adição de plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade incrementou a qualidade do sêmen criopreservado nos carneiros de baixa congelabilidade ($P<0,05$), após a coleta do sêmen. Avaliou-se também a forma de adicionar o plasma seminal ao sêmen após a coleta, sua concentração e forma de sua obtenção. O melhor momento para adição do plasma seminal foi ao meio de pré-diluição. Independentemente da sua concentração adicionado ao sêmen, todas as concentrações utilizadas foram superiores ($P<0,05$) ao tratamento controle (sem adição de plasma seminal). Com relação à sua obtenção, quando adicionado o plasma seminal proveniente de carneiro vasectomizado no sêmen após a coleta, este se mostrou ($P<0,05$) melhor que o tratamento controle (sem adição de plasma seminal) e de plasma seminal de carneiro inteiro. Os dados apresentados nesse trabalho evidenciam a importância do plasma seminal na criopreservação do sêmen e servem referência para o avanço da criopreservação do sêmen ovino.

Palavras-chave: adição, carneiro, congelabilidade, sêmen, vasectomizado.

SEMINAL PLASMA PROTEIN AND ITS INFLUENCE ON ESPERMATIC CRIOPRESERVATION IN RAM

MSc. Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva

Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Brasília, DF

ABSTRACT

The seminal quality vary with many factors like individuality, collections frequency, environment, season of the year, temperature, rainfall. Interfering, directly, in the quality of cryopreserved samples with reflex at conception indices of inseminated females. Studies have demonstrated that seminal plasma can favor the viability and heterogeneity of plasmatic membrane, motility and fertility of cryopreserved ram semen. In this way, the aim of the present work was characterize the protein profile of seminal plasma of rams with different levels of semen congelability and the effect of the addition of seminal plasma of high freezability rams semen in the low freezability semen before cryopreservation. In chapter 2, was observed a superiority ($P < 0.05$) of ram 1 of high freezability semen in relation with ram 18 of low freezability semen after thawed and TRT, based at motility, membrane integrity and acrosomal integrity. In fresh semen evaluation wasn't observed difference ($P > 0.05$) in none of analyzed factors between two rams. In the same way to fertility with natural mating wasn't difference ($P > 0.05$) between the two rams. Selected rams of high and low freezability semen hade theirs characterized protein profile, determined by two-dimensional electrophoresis and the protein identified by mass

spectrometry. A total of 23 spots were successfully identified. Proteins like RSVP14, RSVP20, clusterin, glutathione peroxidase, albumin e lipocalin were exclusively or more expressive in the high freezability rams semen. Proteins like espermadhesin Z13, bodhesin 2 were more expressive in the low freezability rams semen. Those proteins are like potencial markers to quality of frozen semen. In chapter 3 the aim was evaluate the addition of seminal plasma of high freezability ram semen in semen of low freezability rams semen before cryopreservation, observed that the addition of seminal plasma of high freezability semen increased the quality of cryopreserved semen of low freezability semen ($P<0.05$), after semen collection. Evaluated also how the seminal plasma was add to the semen after the collection, your concentration and how was obtained. The better moment to add the seminal plasma was at pre-dilution extender. Regardless of concentration, all concentration tested were higher ($P<0.05$) than control treatment (without seminal plasma). The seminal plasma when collected from vasectomized rams and added to semen after collection showed better ($P<0.05$) than control treatment (without seminal plasma) and seminal plasma from whole ram. The data presented in this work show the importance of seminal plasma in semen cryopreservation and serve as reference to advance at ram semen cryopreservation.

Key-words: addition, ram, freezability, semen, vasectomized.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1. Resultado da prenhez após monta natural. Carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen.....33
- Figura 2.2. Gel representativos do plasma seminal de carneiro 1 de alta congelabilidade(a). As setas indicam as proteínas identificadas com número do *spot* de acordo com a tabela 2.36
- Figura 2.3. Gel representativos do plasma seminal de carneiro 18 de baixa congelabilidade(b). As setas indicam as proteínas identificadas com número do *spot* de acordo com a tabela 2.36
- Figura 2.4. Fluxograma mostrando o total de proteínas encontradas nos carneiros de alta e baixa congelabilidade, proteínas diferencialmente expressas e identificadas.....37
- Quadro 2.1. Proteínas diferencialmente expressas identificadas por espectrometria de massa....38

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, vivo acrossoma íntegro, velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvalinear (VCL). Após a descongelação (HORA 0) e TTR (HORA5). Para os carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen e carneiro 18 de baixa congelabilidade de sêmen.....	34
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 0). Para os quatro tratamentos, T1, T2, T3 e T4.....	63
---	----

Tabela 3.2. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 4). Para os quatro tratamentos, T1, T2, T3 e T4.....	64
---	----

Tabela 3.3. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$; VCL), após a descongelação (HORA 0). Para os quatro tratamentos; T30, T60, T90 e T0.....	65
---	----

Tabela 3.4. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$; VCL), após a descongelação (HORA 4). Para os quatro tratamentos; T30, T60, T90 e T0.....	66
---	----

Tabela 3.5. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 0). Para os tratamentos; VAS, INT e CONT.....67

Tabela 3.6. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 0). Para os tratamentos; VAS, INT e CONT.....68

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide
- BCF: frequência de batimento fragelar
- BSP: proteína de ligação ao espermatozóide (*Bind Sperm Protein*)
- CTC: Clortetlaciolina
- EROS: espécies reativas de oxigênio
- GSHPx: glutathiona peroxidase
- IA: inseminação artificial
- IEF: focalização isoeletrica
- IP: Iodeto de propídio (*Propidium iodide*)
- FITC-PNA: isotiocianato de fluoresceína associada a aglutinina de *Pisum sativum* (*Fluorescein isothiocyanate conjugated to Pisum nativum agglutinin*)
- kDa: kiloDalton
- kg: quilograma
- LDL: lipoproteína de baixa densidade
- LIN: linearidade
- mg: miligrama
- MHz: megahertz
- MP: motilidade Progressiva
- MT: motilidade Total
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
- pI: ponto isoeletrico
- RSVP: proteína da glândula vesicular de carneiros (*Ram Seminal Vesicle Protein*)
- RSVP14: proteína da glândula vesicular de carneiros de 14 kDa
- RSVP20: proteína da glândula vesicular de carneiros de 20 kDa
- SDS: dodecil-sulfato de sódio
- TTR: teste de termo resistência
- 2D-PAGE: eletroforese bidimensional
- µl - microlitro
- VAP: Velocidade da trajetória média
- VCL: Velocidade curvilínea
- VSL: Velocidade linear

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura na região centro-oeste vem demonstrando crescimento principalmente com ovinos deslanados destinados a produção de carne, considerando que esta região apresenta uma expressiva produção de grãos, proporcionando uma alimentação com custos mais baixos.

Essa espécie vem despertando interesse de produtores e órgãos governamentais, sendo uma alternativa desejável para o incremento da atividade pecuária no país e para uma melhor distribuição de renda. Com o crescimento desse mercado, existe o interesse em intensificar sua exploração econômica, com programas de melhoramento genético animal, teste de progênie e aplicação de biotécnicas reprodutivas, considerando as características de adaptação as diferentes condições ambientais, permitindo assim o aumento do seu índice produtivo.

A eficiência reprodutiva é um dos fatores mais importantes para a produtividade de um rebanho. Portanto, em qualquer sistema de produção é essencial uma avaliação da fertilidade de machos e fêmeas. Do ponto de vista econômico, um reprodutor com características zootécnicas e genéticas desejáveis e com sêmen de qualidade significa rápido retorno de investimento, principalmente com o sêmen destinado a inseminação artificial (IA) constituindo uma grande ferramenta para um rápido melhoramento do rebanho.

Desta forma a IA em programas de melhoramento animal, utilizando reprodutores geneticamente superiores, sem dúvida é a biotecnologia de maior impacto no incremento genético dos rebanhos (Bergmann & Penna, 1999). A exploração do potencial da IA é significativo pela viabilização de uma técnica baseada na utilização de sêmen congelado, considerando que o uso de sêmen fresco é limitado pelo período restrito de viabilidade, curto período de estocagem e o

aproveitamento limitado dos reprodutores (Evans & Maxwell, 1990). Assim, o sêmen congelado viabiliza um melhor aproveitamento de reprodutores geneticamente superiores.

Porem os resultados com a utilização de sêmen criopreservado não são satisfatórios, sendo pela baixa taxa de prenhez na IA cervical, ou seja, pelas alterações bioquímicas e moleculares das células submetidas à congelação e descongelação como também pela reduzida competência de sobrevivência dos espermatozoides. Embora a deposição intrauterina do sêmen congelado proporcione taxas de prenhez semelhantes às obtidas com sêmen fresco, o elevado custo desta técnica inviabiliza seu uso mais amplo (Evans & Maxwell, 1990; Cardoso et al., 2009).

A despeito de taxas relativamente altas de espermatozoides móveis após a descongelação o desempenho obtido com o uso de sêmen congelado é bem inferior aquele alcançado com o sêmen a fresco. A sobrevivência pós-congelação é restrita em torno de no máximo 50%, mesmo com as melhores técnicas de preservação (Salamon & Maxwell, 2000).

Esta reduzida viabilidade dos espermatozoides congelados-descongelados está correlacionada com evidências de que os mesmos que sobrevivem a este processo têm suas membranas alteradas a um estagio que pode conferir características similares às células capacitadas e/ou com reação de acrossomo, caracterizando uma capacitação espermática precoce (Perez et al., 1996; Watson, 2000).

Estudos demostram a importância do plasma seminal auxiliando positivamente na fertilidade, servindo também de diluente e veiculo para os espermatozoides e exercendo ação estimulante na motilidade espermática durante a ejaculação. Também é fonte de energia, tem capacidade tamponante, mantém a integridade da membrana celular dos espermatozoides. (Maxwell et al., 1999). Quando o plasma seminal foi adicionado ao sêmen observou-se melhora na viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do sêmen criopreservado de carneiros e melhores resultados de IA cervical superficial (Ollero et al., 1997; Maxwell et al., 1999; Silva et al., 2005).

Na espécie ovina, alguns estudos têm relatado a expressão de proteínas no plasma seminal que exercem efeito positivo sobre a capacitação espermática e proteção dos espermatozoides de carneiros de raças europeias (Pérez-pé et al., 2001; Barrios et al., 2005; Fernández-juan et al., 2006; Cardozo et al., 2006). Até o momento, ainda são bastante incipientes em comparação com os avanços descritos em bovinos.

Sabe-se também que um problema de importância prática na indústria de criopreservação de sêmen ovino é a existência de animais denominados de alta e baixa congelabilidade. Independentemente da boa qualidade seminal *in natura* e de bons resultados de prenhez com monta natural, alguns animais apresentam maior sensibilidade à criopreservação.

Desta forma, o conhecimento do perfil protéico do plasma seminal de ovinos possibilita a utilização de proteínas do plasma seminal como marcadores moleculares, cuja presença ou ausência, possa ser associada com parâmetros de qualidade seminal e fertilidade, podendo auxiliar futuramente na seleção de reprodutores.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Identificar proteínas do plasma seminal de reprodutores ovinos com sêmen de alta e baixa congelabilidade. Determinar possíveis marcadores associados com o índice de congelabilidade de sêmen ovino investigar *in vitro* a adição do plasma seminal de reprodutores ovinos de alta congelabilidade de sêmen ao sêmen criopreservado de reprodutores ovinos de baixa congelabilidade de sêmen como alternativa para aumentar a viabilidade espermática do sêmen congelado.

1.1.2 Específicos

- Identificar os reprodutores ovinos de alta e baixa congelabilidade de sêmen utilizando parâmetros *in vitro* da motilidade e integridade de membrana plasmática;
- Analisar e caracterizar proteínas do plasma seminal, de reprodutores ovinos de alta e baixa congelabilidade de sêmen;

- Verificar o efeito da adição do plasma seminal de carneiros alta congelabilidade de sêmen no sêmen de reprodutores ovinos de baixa congelabilidade de sêmen após a coleta de sêmen, quanto;

- Ao método de adição do plasma seminal ao sêmen após a coleta.
- Ao efeito da concentração de plasma seminal adicionado ao sêmen após a coleta.
- A adição de plasma seminal oriundos de carneiros inteiros e vasectomizados.
- Mediante avaliação *in vitro* quanto à motilidade, cinética espermática, integridade de membrana, integridade de acrossoma em diferentes tempos de incubação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação do sêmen e seus danos à célula

O processo de criopreservação de sêmen é determinado por algumas fases desde a redução da temperatura, desidratação celular, congelação e descongelação. Durante essa sequencia algumas alterações nas células espermáticas podem resultar em uma marcante redução da fertilidade quando comparado ao sêmen fresco (Medeiros et al., 2002).

A sobrevivência dos espermatozoides ovinos criopreservados pode ser afetada por vários fatores, tais como a composição do diluidor, a concentração do crioprotetor, o envase (palheta, minitubo, *pelets*), o curso da refrigeração, da congelação e da descongelação, bem como, a qualidade inicial do sêmen (Bag et al., 2002).

A razão pela baixa capacidade de fertilização e taxas reduzidas de concepção após a IA cervical, esta relacionada a mudanças severas em estrutura e funcionalidade ocorridas no processo de congelação e descongelação do sêmen (Pérez et al., 1996). Os espermatozoides de carneiros são sensíveis a mudanças extremas de temperatura durante o processo de congelação-descongelação, o que é prejudicial a sua motilidade e a integridade de membrana (Salamon & Maxwell, 1995).

A membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência espermática no trato reprodutivo feminino e na manutenção de sua capacidade fecundante, visto que, garante a homeostase celular, sendo essencial para manter a viabilidade. (Maxwell & Watson, 1996). Mas durante a criopreservação ocorrem modificações nas membranas, tendo como consequência

danos ultraestruturais, bioquímicos e diminuição na capacidade fecundante (Celeghini et al., 2005).

Valcarcel, (1997) relata que lesões nas membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais foram indicadas como as principais causas de danos estruturais e de perdas funcionais, impostas pela criopreservação. Segundo Salamon & Maxwell (1995) apesar de 40 a 60% dos espermatozoides de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelção, somente 20 a 30% deles permanecem biologicamente inalterados. Estas células podem estar móveis, mas danificadas, de tal maneira que a fertilização fica improvável. Valcarcel et al. (1994), sugerem que pelo menos 30% dos espermatozoides ovinos que mantém a motilidade após congelção/descongelção têm lesão da membrana plasmática.

As membranas dos espermatozoides especialmente afetadas pela criopreservação são a plasmática, a acrossomal externa e as mitocondriais (Watson, 1995), sendo as lesões nessas estruturas indicadas como as principais causas de danos estruturais e de perda funcional da célula espermática (He et al., 2001). Segundo Harrison & Vickers, (1990) e Valcárcel et al. (1997), a membrana plasmática é mais frágil que a membrana acrossomal externa e parece ser consideravelmente ainda mais frágil que a mitocondrial, sendo assim, sua preservação é o ponto mais crítico para o sucesso da criopreservação.

Pesquisando o dano acrossomal nos espermatozoides ovinos submetidos ao choque pelo frio, Harrison & Vickers (1990) observaram que algumas células com acrossomo intacto apresentavam-se com membrana plasmática lesada, ficando evidente a fragilidade da membrana plasmática. As alterações na cinética juntamente com a injúria mitocondrial que ocorrem em decorrência dos procedimentos de preservação do sêmen podem explicar o prejuízo no transporte espermático e a morte prematura de um grande número de espermatozoides nas porções anteriores mais caudais do trato reprodutivo feminino após a deposição cervical ou vaginal (Gillan et al., 2004).

Os processos de refrigeração e congelção do sêmen antecipam a maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozoides capacitados ou com o acrossomo reagido em comparação ao sêmen *in natura* (Maxwell & Watson, 1996). A sua sobrevivência é então limitada porque os espermatozoides capacitados não possuem um período de vida prolongado, eles são ativados como preparação para o encontro do oócito e se isso não ocorrer, em um curto período de tempo, eles morrem (Watson, 1995).

Corroborando com essas afirmações, Garde et al. (1993) avaliaram os efeitos da congelação e descongelação sobre a reação acrossomal em espermatozoides ovinos através da realização de testes *in vitro* de penetração espermática e indicaram que o sêmen *in natura* requer um maior período de capacitação do que o sêmen congelado. Segundo os autores, o processo de congelação-descongelação favorece a reação acrossomal o que levou a maiores índices de penetração dos espermatozoides nas primeiras horas de incubação (0h-74,1%; 3h-60,9%) comparado ao sêmen *in natura* (0h-19,6%; 3h-40,9%). Além disso, o sêmen congelado perdeu sua habilidade fecundante *in vitro* com mais rapidez que o sêmen *in natura*.

Gillan et al. (1997), baseando-se nos padrões da clortetraciclina (CTC), observaram que a maioria dos espermatozoides do sêmen *in natura* estavam no padrão não capacitado (61,3%), com o restante da população distribuída entre os padrões capacitados e com reação acrossomal. Após a incubação por seis horas, os espermatozoides sofreram processo de capacitação espontânea com a maioria da população apresentando o padrão capacitado (54%) e com acrossomo reagido (41%). Em contraste, espermatozoides congelados-descongelados foram distribuídos principalmente nos padrões capacitados (65,9%) e com reações acrossomal (25,9%), com somente uma proporção de células permanecendo não capacitadas (6,7%) logo após a descongelação.

De acordo com Gillan et al. (1999), quando o sêmen *in natura* ou congelado foi depositado no útero por laparoscopia e posteriormente colhido observou-se que a área do trato no qual os espermatozoides eram recuperados parecia influenciar o padrão da membrana espermática com mais células apresentando padrão não capacitado no istmo que no útero. Tanto os espermatozoides frescos como os congelados colhidos do trato tinham passado dos estados não capacitado e capacitado para o estado de reação acrossomal, porém mais espermatozoides apresentando acrossomo reagido foram encontrados nas amostras colhidas de ovelhas inseminadas com espermatozoides congelados que naquelas inseminadas com sêmen *in natura*.

Se o sêmen é depositado no início da cervix, as células espermáticas sofrem o que é chamado de reação acrossomal prematura e subseqüentemente morrem, resultando em baixa fertilidade, quando utilizado o sêmen congelado. A deposição de células capacitadas próximo ao sítio de fertilização como no útero e próximo ao momento da ovulação, pode minimizar os efeitos do envelhecimento celular e altas taxas de fertilização, comparadas àquelas com sêmen *in natura*, podem ser atingidas (Gillan et al., 1997).

2.2 Plasma seminal

O plasma seminal é o produto das secreções das glândulas acessórias (próstata, glândula vesicular, glândulas bulbouretrais), dos epidídimos, e dos condutos deferentes se integrando aos espermatozoides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas (Evans & Maxwell, 1990). A sua composição inclui aminoácidos, açúcares, minerais, fosfatases, prostaglandinas e proteínas de uma faixa ampla de massa molecular (Evans & Maxwell, 1990).

O plasma seminal exerce também um papel importante na promoção da fertilidade, pois possui proteínas, que se ligam aos espermatozoides, e que podem influenciar na capacidade de fertilização da célula. Porém, alguns fatores, que interferem negativamente na fertilidade, já foram identificados no plasma seminal como a seminaplasmina bovina e o fator 1 da antifertilidade humana, que inibem a capacitação ou a reação acrossômica, interferindo na fertilidade (Killian et al. 1993).

Em carneiros, o plasma seminal é um fluido de aspecto claro e opaco, mas o ejaculado pode ser branco e cremoso devido à elevada concentração de espermatozoides. É composto em sua maior parte por água (75%), contém inúmeros componentes orgânicos e inorgânicos que servem para nutrir e proteger os espermatozoides (Evans & Maxwell, 1987). Há também componentes tais como, macro elementos (entre eles: cálcio, sódio e potássio), lipídeos (principalmente os fosfolipídios, colesterol), micro elementos (zinco, cobre e ferro), prostaglandinas, carboidratos, compostos nitrogenados (colina e poliaminas), proteínas, enzimas e antioxidantes (Maxwell et al., 1999).

Inúmeras pesquisas em varias espécies vêm sendo realizadas com o plasma seminal, pesquisas essas que buscam analisar o efeito do plasma seminal na qualidade do sêmen. Consequentemente poder identificar componentes que poderão contribuir como potenciais marcadores que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo (Jobim et al., 2009).

As proteínas do plasma seminal exercem importantes funções nos espermatozoides, desde a regulação da atividade espermática, estabilidade da membrana plasmática, da capacitação

espermática, até a fertilidade (Muiño-Blanco et al., 2008), tendo as proteínas um potencial marcador molecular. As proteínas presentes no plasma seminal participam diretamente na proteção dos espermatozoides (Maxwell et al., 2007).

O transito e armazenamento dos espermatozoides no epidídimo, podem sofrer severos danos relacionados ao estresse oxidativo, causados por espécies reativas de oxigênio (EROS), a produção em excesso de EROS pode causar uma série de danos na função espermática e interferir na fertilidade (Nichi et al., 2006). O epidídimo dispõe de várias enzimas antioxidantes como as já identificadas glutatona S-transferases, tioredoxina peroxidases, superóxido dismutases, glutatona peroxidases (GSHPx) e catalases. A GSHPx constitui um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática, esta enzima é abundante no fluido da cauda epididimária, e também pode se ligar à membrana dos espermatozoides (Dacheux et al., 2006)

A glicoproteína denominada de clusterina foi encontrada na próstata, glândulas vesiculares, testículo, espermatozoides luminais e epidídimo (Braundmeier et al., 2001). A clusterina pode inibir também a precipitação protéica induzida pelo estresse, solubilizando-as e protegendo as células dos efeitos citotóxicos da precipitação protéica. Sendo assim, essa proteína pode participar na proteção das membranas, podendo ser importante principalmente na interação espermatozoide trato reprodutivo feminino (Braundmeier et al., 2001). Outra proteína envolvida na proteção da membrana espermática, causado pelo estresse oxidativo e apresentando um elevado poder antioxidante protegendo os espermatozoides é a albumina, a qual tem sido identificada no epidídimo e plasma seminal em ovinos (Rego, 2010).

Outras proteínas envolvidas na estabilidade da membrana e com o poder de exercer um efeito protetor ao espermatozoide ovino são as proteínas pertencentes à família das BSPs (*Binder of Sperm Proteins*), em ovinos conhecidas como *Ram Seminal Vesicles Protein* (RSVP). As RSVP possuem homologia em sua sequência de aminoácidos com proteínas da família BSP. As BSPs e seus homólogos constituem um grupo de proteínas conservadas e estruturalmente similares que possuem domínios de fibronectina tipo II (Manjunath et al., 2009).

As RSVPs atuam na função de proteção dos espermatozoides, prevenindo (PÉREZ-PÉ et al., 2001) e reparando (BARRIOS et al., 2000) danos na membrana espermática sofridos durante a criopreservação. Barrios et al. (2005) verificaram que proteínas de 14 e 20 kDa do plasma seminal de ovinos eram adsorvidas pela superfície dos espermatozoides, estabilizando-a e prevenindo contra injúrias após tratamento para indução de choque térmico. A proteção ocorre

por conta da estabilização da membrana espermática e esta relacionada a uma ação decapacitante. Observou que a proteína de 20 kDa foi liberada após o início da capacitação espermática e a proteína de 14 kDa liberada após a indução da reação acrossomal.

Essas proteínas podem ser responsáveis pela proteção conferida aos espermatozoides contra o choque térmico (Barrios et al, 2005), podendo também estar envolvidas no processo de fertilização, com isso abrindo novas possibilidades na investigação do papel dessas proteínas como marcadores de fertilidade (Cardozo et al., 2008).

Fernandez-Juan et al. (2006) demonstraram que estas proteínas tinham seu local de síntese restrito à glândula vesicular, expressas no citoplasma das células de seu epitélio secretor, passando a referenciar estas proteínas como RSVP (*Ram Seminal Vesicle Protein*) de 14 e 20 kDa (RSVP14 e RSVP20 respectivamente). Apesar da RSVP14 e RSVP20 serem semelhantes quanto à proteção do espermatozoide, o estudo comparativo de sua sequência de aminoácidos mostra que de fato trata-se de proteínas diferentes (Barrios et al., 2005). A sequência de aminoácidos da RSVP14 apresenta grande homologia com a proteína do plasma seminal bovino BSP-A1/A2.

Segundo (Muiño-Blanco et al., 2008), as proteínas RSVP14 e RSVP20 estabilizam os fosfolipídeos de membrana, exercendo efeito protetor aos espermatozoides ovinos durante a criopreservação seminal, preservando a membrana espermática, reduzindo a criocapacitação. Estas proteínas se tornam potentes ferramentas para melhoria na formulação de melhores diluidores e aperfeiçoando a técnica de criopreservação.

Estes estudos geralmente são baseados na composição do plasma seminal considerando machos com diferentes padrões de fertilidade, ou pelo isolamento de fatores contidos no plasma seminal que facilitam ou inibem a capacitação ou a fertilização (Killian et al., 1993; Jobim et al., 2005; Cardoso et al., 2006). Em ovinos da raça Santa Inês, o perfil protéico do plasma seminal passa por alterações relevantes ao longo do desenvolvimento reprodutivo, refletindo associações com a função espermática e outros aspectos da maturidade sexual desses animais (Souza et al., 2010).

Roncoletta (1999) estudou o perfil eletroforetico em SDS-PAGE das proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal de taurinos e zebuínos doadores de sêmen, em uma central, separando dois grupos de congelabilidade de acordo com a aprovação das doses destes touros pela central. Observou uma quantidade de cerca de 20% a mais de proteínas totais no plasma seminal de zebuínos quando comparados aos taurinos, e encontrou diferenças na

concentração e frequência de algumas bandas, entre os grupos de alta, media e baixa congelabilidade.

Maxwell et al. (1999) descreveram que o plasma seminal apresenta efeito benéfico sobre a função espermática e sobre fertilidade de sêmen congelado, ovino após IA cervical. A adição do plasma seminal ao sêmen descongelado vem demonstrando uma melhoria na sua qualidade e também nos índices de prenhez na IA cervical (Silva et al., 2005). Cardozo et al., (2009) observaram uma perda de proteínas de membrana após o descongelamento, indicando que essas proteínas devem ter sido perdidas como resultado de danos induzidos pelo processo de congelamento/descongelamento. Bernardini et al., (2011) demonstraram que a adição de plasma seminal de carneiros de raças diferentes juntamente com uma fonte de energia melhorou a qualidade do sêmen.

Cardozo et al., (2006) detectaram diferenças entre as proteínas ao longo do ano e correlacionam esta diferença com a variabilidade encontrada na qualidade do sêmen durante as diferentes estações e épocas do ano. Neste estudo foram encontradas 13 proteínas que apresentam variações significantes durante as estações do ano. As frações 3 (15kDa) e 15 (16.1kDa) foram mais abundantes no verão e negativamente correlacionadas com a viabilidade espermática. A maior concentração destas duas proteínas durante o verão pode, segundo os autores, explicar a baixa qualidade espermática encontrada durante estes meses. A fração 9 (73,2 kDa) diminuiu significativamente a partir do início do verão e está correlacionada com a viabilidade espermática. O que mais uma vez justificaria a baixa qualidade espermática durante os meses mais quentes. Esta proteína pode ter um efeito protetor na membrana espermática, mantendo a integridade da membrana e, portanto a funcionalidade dos espermatozoides requerida para a capacitação, reação acrossomal e penetração do oócito.

Rêgo (2010) observou que as proteínas mais abundantes no plasma seminal pertencem às famílias das BSPs e espermadesinas. Em função dos atributos bioquímicos destes componentes, sugere-se que, em ovinos, estes dois grupos de proteínas exerçam papéis importantes na fisiologia reprodutiva, participando da capacitação espermática, formação do reservatório espermático no nas tubas e interação espermatozoide-oócito.

As proteínas exercem papéis cruciais em todos os processos biológicos (Jobim et al., 2003). Isto justifica, portanto, a gama de estudos desenvolvidos nesta área, os quais visam o entendimento dos complexos mecanismos de ação das mesmas dentro das mais variadas classes

de seres vivos. O conjunto de proteínas expresso por um genoma ou tecido é chamado de proteoma. Técnicas como a eletroforese bidimensional, espectrometria de massa e bioinformática são importantes ferramentas para a análise de proteomas. A identificação de proteínas a partir dessas técnicas são métodos estabelecidos e tem sido aplicado a numerosos sistemas biológicos.

Em diversas espécies, técnicas avançadas de proteômica têm sido utilizadas para a detecção de marcadores moleculares de fertilidade e de congelabilidade dos espermatozoides. Grande parte dos estudos sobre proteínas do plasma seminal está relacionada com espécies de mamíferos domésticos como bovinos, suínos, ovinos e equinos, espécies com valor econômico considerável e nas quais estudos sobre a fisiologia da reprodução têm ocorrido há muitos anos (Killian et al., 1993; Roncoletta et al., 1999; Jobim et al., 2005; Moura et al., 2006).

O método aplicado com maior frequência nas análises de proteomas é a eletroforese unidimensional do tipo SDS-PAGE, que apesar da limitação de separar proteínas apenas pelo peso molecular, é uma alternativa mais econômica e que em estudos iniciais de proteomas pode contribuir de maneira significativa. Até agora, um dos métodos com melhor resolução na separação de proteínas é a eletroforese bidimensional. Esta técnica é considerada como a base para construir mapas de proteoma e foi desenvolvida em 1975 (James, 1997). A técnica de eletroforese bidimensional foi submetida a uma série de modificações melhorando a resolução e reprodutibilidade (Lopez, 1999; Brandon et al., 1999).

Nas décadas de 1950 e 1960, a técnica de eletroforese começou a ser utilizada para mapear e identificar componentes proteicos solúveis de ejaculados (Bennet, 1964). Através de eletroforese unidimensional, o perfil proteico do plasma seminal bovino foi correlacionado com padrões de fertilidade normais e alterada (Wolf et al., 1993); com a congelabilidade (Roncoletta et al., 1999) e com a viabilidade do sêmen (Aurich et al., 1996).

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) de alta resolução, envolve como o próprio nome diz, duas dimensões, de acordo com O'Farrel (1975) e Klose (1975). A primeira dimensão consiste da focalização isoeletrica (IEF) e a segunda dimensão é a SDS-PAGE. O parâmetro de separação da primeira dimensão, o pI (ponto isoeletrico), é independente do peso molecular, o qual é o parâmetro de separação da segunda dimensão. O resultado da separação é um padrão de "spots", e de acordo com o sistema de coordenadas cartesianas, o seguinte padrão de representação é considerado: da esquerda para a direita correspondente ao aumento do pI e de baixo para cima, correspondente ao aumento do peso molecular. A autorradiografia de proteínas

marcadas e a coloração com prata são usadas frequentemente na obtenção destes mapas bidimensionais, os quais oferecem alta resolução na separação de proteínas.

Alta reprodutibilidade da posição dos spots é muito importante na interpretação. A avaliação dos padrões 2D-PAGE é feita em computador, onde os eletroferogramas são então convertidos em sinais digitais com densitômetros, *scanner desk top* de alta resolução ou câmeras de vídeo. Com um software para avaliação apropriada, os dados são processados para análises qualitativas e quantitativas, as quais podem ser auxiliadas por bases de dados via rede internacional (Westermeier, 1997).

Outro método aplicado de forma expressiva nos últimos anos para estudar os mecanismos celulares envolvendo proteínas é a espectrometria de massa, a qual identifica qualquer molécula específica ou moléculas componentes de uma mistura. Em geral, esta não é uma técnica quantitativa, entretanto, oferece alta exatidão no mensuramento de massa. O nível de precisão de espectrômetros de massa chega ao ponto da possibilidade de distinção de duas moléculas que diferem entre si apenas pela presença de um carbono-13 (Cunha et al., 2006).

Com o rápido conhecimento desenvolvido nos últimos anos, marcadores bioquímicos têm sido descritos para a detecção de algumas propriedades biológicas de qualidade seminal (Fraser et al., 2006). O uso destes marcadores moleculares poderá ajudar a desenvolver novos critérios para a predição e aumento da fertilidade de reprodutores.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, J. E.; HOPPE, H.; Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v.46, p.791-797, 1996.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.72, p.175-183, 2002.

BARRIOS B. et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, 588–595, 2005.

BENNET, J.P. Microeletrophoresis of bull, ram, boar & rabbit seminal plasma proteins. **In: Atti del V° Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale** (Trento, Italia). pp.186-189, 1964.

BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, M.W.; FORNES, R.H.; ALBERIO, A.; CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, p. 436-447, 2011.

BERGMANN, J. A. G.; PENNA, V. M. O impacto de novas biotecnias em programas de melhoramento animal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.27, n.1, supl., p.110-132, 1999.

BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B. e FAYER-HOSKEN, R.A. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**. v.52, p.863-873, 1999.

BRAUNDMEIER, A.G., MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.84, p.1915-1925, 2001.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T. Identification of rsvp14 and rsvp20 components by two-dimensional electrophoresis and western-blotting. **Reproduction in Domestic Animals**, v 43, p. 15-21 2008.

CARDOZO, J.A.; GRASA, P.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN, J. A. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. **Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v 10 p. 51-59, 2009.

- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. **Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga.** 186p, 2005.
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.36, p.40-46, 2006.
- DACHEUX, J.L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, p.319–341, 2005.
- EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras.** Zaragoza: Acribia, 1990. 191p.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats.** Sidney: Butterworths, 1987. 194 p.
- FERNÁNDEZ-JUAN, M. et al. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p.721–732, 2006.
- FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A.; PŁUCIENNICZAK, G.; KOTŁOWSKA, M.; KORDAN, W.; WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.; STRZEŻEK, J. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reproductive Biology**, v.6, p.5-20, 2006.
- GARDE, J.; GUTIÉRREZ, A.; ARTIGA, C. G.; VÁZQUEZ, I. Influence of freezing process on in vitro capacitation of ram semen. **Theriogenology**, v.39, p.225, 1993.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p.481-487, 1997.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 447-454, 2004.
- HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., SHARPE, P., BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

HE, L; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**, v.64, p.69-70, 2001.

KILLIAN, G. J., CHAPMAN, D. A., ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p. 1202-1207, 1993.

JAMES, P. Genomes and proteomes. **Biochemistry Biophysics Research Community**, v.3, 231 p. 1-6. 1997.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; MATTOS, R.C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do semen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, RS, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P.; MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.63, p.2053-2062, 2005.

JOBIM; M.I.M.; GREGORY; R.M.; MATTOS; R.C. Proteínas do plasma seminal relacionadas à congelabilidade do sêmen bovino. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**; Belo Horizonte; Anais... Belo Horizonte; 2009

LOPEZ, M. F., Proteome analysis. Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B. Biomedical Science**, v. 5; p. 191-202. 1999.

MANJUNATH, P; LEFEBVRE, J; JOIS, P.S; FAN, J; WRIGHT, M.W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.80, p.394–397, 2009.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MAXWELL, W. M. C., EVANS, G., MORTIMER, S. T. *et al.* Normal fertility in ewes after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, Sydney, v.11, p.123-126, 1999.

MAXWELL, W. D.E.; GRAAF, S.; GHAOUI, R.; EVANS. G.; Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Soc Reprod Fertil Supp** 64, 13–38, 2007.

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

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN GJ. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, p.201–211, 2006.

MUIÑO-BLANCO, R.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PÉ, J. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim* 43, 18–31, 2008

NASS, S.J.; MILLER, D.J.; WINER, M.A. e AX, R.L. Male accessory Sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular and Reproduction Development**, v.25, p.237-246, 1990.

NICHI, M. MILLER, D.J.; JARVA, H. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, Amsterdam, v.66, p.822-828, 2006.

OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reprod. Fertil. Dev.** Zaragoza, v.9, p. 381-390, 1997.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

PÉREZ, L. J., VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., *et al.* The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, Buenos Aires, v.47, p.549-558, 1996.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v.56, p.425-434, 2001.

RÊGO, J.P.A.; Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos. Dissertação (Mestrado) – **Universidade federal do Ceará - Centro de ciências agrárias departamento de zootecnia - Programa de pós-graduação em zootecnia**. 106p, 2010.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.36, 1999.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.62, p.77-111, 2000.

SILVA, T. A. S. N., NEVES, J.P., BRAGANÇA, J. M., GONÇALVES, P.B.D., RUMPF, R. Uso do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino para inseminação transcervical em ovelhas com estro sincronizado. **Anais da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – XIX SBTE** Angra dos Reis, 2005.

SOUZA, C. E. A. et al. Reproductive development of Santa Ines rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animal**, Malden, v.45, p.644–653, 2010.

VALCÁRCEL, A.; De Las HERAS, M. A.; PERÉZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489, 1994.

VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299-309, 1997.

WOLF, D.F., BRADLEY, J.T. & RIDDEL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083-1091, 1993.

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

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

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide for methods and applications of DNA and protein separations**. 2. Ed., Weinheim: VHC. 1997.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS DE ALTA E BAIXA CONGELABILIDADE DE SÊMEN

Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva^a, Angela Mehta^b, Vladinis de Oliveira Miranda^a, Lilian Travassos^b, Mauricio Machain^b, Bianca Damiani Marques Silva^b, Alexandre Floriani Ramos^b, Jairo Pereira Neves^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brasil;

^bEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil;

1 RESUMO

O conhecimento de proteínas do plasma seminal de carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen pode contribuir para uma melhor compreensão da ação de proteínas do plasma seminal sobre a criopreservação do sêmen ovino. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar as proteínas do plasma seminal relacionadas com os carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen. O ejaculado de 18 carneiros da raça Santa Inês foram colhidos para a criopreservação de sêmen e obtenção de plasma seminal. Baseado nos parâmetros de motilidade, integridade de membrana e integridade de acrossoma, após a descongelação e TTR, os carneiros foram diferenciados entre alta e baixa congelabilidade de sêmen. Identificados os carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen a identificação das proteínas do plasma seminal dos mesmos foi determinada por eletroforese bidimensional e a identificação das proteínas foi realizada por espectrometria de massa. Foram revelados 314 *spots* por gel dos carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen. Um total de 97 *spots* foram diferencialmente expressos, sendo que 23 *spots* foram identificados com sucesso, incluindo 10 proteínas expressas apenas no carneiro de alta congelabilidade de sêmen como RSVP14, RSVP20 e clusterina. Essas proteínas apresentam relevante importância na proteção dos espermatozoides ao choque térmico, estresse oxidativo e danos a criopreservação de sêmen. Outras 10 proteínas tiveram sua expressão aumentada no carneiro de alta congelabilidade. Além de isoformas das proteínas RSVP14, RSVP20 e clusterina, foram identificadas as proteínas glutathione peroxidase, albumina e lipocalina, com funções protetoras da membrana plasmática, estresse oxidativo, motilidade, fertilidade. Um total de 3 proteínas diminuídas no carneiro de alta congelabilidade foram também identificadas como espermedesina Z13, bodesina 2 e beta-microseminoprotein. A espermedesina Z13 tem relação

com baixa motilidade e baixa fertilidade. A bodesina 2 é pouco estudada quanto a sua relação com a qualidade do sêmen. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a associação entre a congelabilidade do sêmen ovinos com as proteínas do plasma seminal encontradas nos carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen.

Palavras-chave: congelabilidade, criopreservação, ovino, plasma seminal, proteínas, sêmen.

2 ABSTRACT

PROTEIN SEMINAL PLASMA IDENTIFICATION OF HIGH AND LOW FREEZABILITY RAM

The knowledge of protein profile of seminal plasma of high and low freezability rams can contribute to a better comprehension of seminal plasma protein action in ram semen cryopreservation. In this way, the aim of this work was characterized the proteins of seminal plasma related with high and low freezability rams. The ejaculated of 18 Santa Inês rams were collected to semen cryopreservation and plasma seminal achievement. Based at motility, membrane integrity and acrossomal integrity, after thawed semen and TRT, the rams were differentiated between high and low freezability. Identified high and low freezability rams, their protein profile of seminal plasma were determined by two-dimensional electrophoresis and the protein identified by mass spectrometry. Were revealed 314 *spots* per gel of high and low freezability. A total of 97 *spots* were differentially expressed, these 23 *spots* were successfully identified, included 10 proteins only expressed in high freezability rams, like RSVP14, RSVP20 e clusterin. These proteins show importance at sperm protection to termal shock, oxidative stress and damage to cryopreservation. Others 10 proteins had higher expression at high freezability ram. Beside isoforms of proteins RSVP14, RSVP20 and clusterin, were identified the proteins glutathione peroxidase, albumin and lipocalin, with protection function of plasmatic membrane, oxidative stress, motility and fertility. A total of 3 proteins diminished at high freezability ram were also identified as espermadhesin Z13, bodhesin 2 e beta-microseminoprotein. The espermadhesin Z13 has relation with low motility e low fertility. The bodhesin 2 is understudied in relation with semen quality. The obtained results in this work show the association between ram semen freezability with proteins founded in high and low freezability rams.

Key-words: seminal plasma, proteins, semen, freezability.

3 INTRODUÇÃO

A eficácia da congelabilidade do sêmen é um fator fundamental para a preservação de material biológico permitindo a realização com êxito da técnica de inseminação artificial (IA) e consequentemente para o melhoramento genético. Entretanto o procedimento de criopreservação do sêmen ovino resulta na redução da capacidade de fecundação dos espermatozoides em relação a sua qualidade original no sêmen fresco (Salamon & Maxwell, 1995). Isto se deve, em primeiro lugar, pelo fato de que 40-50% dos espermatozoides não sobrevivem à criopreservação, mesmo utilizando os melhores protocolos de congelamento existentes na atualidade, devido a modificações bioquímicas, funcionais e estruturais da membrana plasmática, permanecendo apenas uma subpopulação de espermatozoides viáveis (Valcarcel, 1997; Bittencourt et al., 2013).

Um problema de importância significativa na indústria de criopreservação de sêmen ovino é a existência de animais denominados de alta e baixa congelabilidade. Ou seja, independentemente de uma boa qualidade seminal prévia *in natura* e de resultados satisfatórios de prenhez após a monta natural, alguns animais evidenciam maior sensibilidade à criopreservação. Em virtude dessas características, torna-se interessante a busca de elementos capazes de promover uma identificação de marcadores moleculares desses animais.

Alguns estudos vêm sendo conduzidos para tentar identificar proteínas presentes no plasma seminal que possam estar relacionadas com a proteção aos espermatozoides, capacitação espermática e fertilidade (Pérez -Pé et al., 2001; Barrios et al., 2005; Fernández-juan et al., 2006; Cardozo et al., 2008). Entretanto, poucos esforços têm sido realizados na busca dos fatores que levam à resistência a criopreservação. Neste contexto, o estudo de proteínas do plasma seminal é de extrema importância para a identificação de marcadores bioquímicos visando a predição da

fertilidade masculina (Fraser *et al.*, 2006). Desta forma, este trabalho teve o intuito de identificar, dentro de uma população de carneiros, o animal de maior e o de menor congelabilidade de sêmen e identificar proteínas relacionadas com a resistência à criopreservação de sêmen ovino.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado de agosto a dezembro na Fazenda Experimental Sucupira, Riacho Fundo, DF, Brasil (15°52'-15°56'S 48°00'-48°02'O). A altitude no local varia de 1050 a 1250 metros, sendo o clima predominante o Koppen Aw, indicando inverno seco (umidade relativa pode chegar a 10%) e verão chuvoso.

Amostras de sêmen congelado de 18 carneiros da raça Santa Inês foram utilizadas no presente experimento. Um total de 7 ejaculados totalizando 7 partidas de cada carneiro foi coletado e fracionado em duas partes, sendo uma utilizada para criopreservação de sêmen e a outra para análise proteômica do plasma seminal. Para a avaliação do sêmen descongelado e teste de termo resistência (TTR), foram descongeladas 4 palhetas de cada partida (7x4=28 amostras por carneiro) dos 18 carneiros.

De acordo com o resultado da análise estatística do sêmen dos 18 carneiros, foi selecionado apenas o carneiro de maior e menor congelabilidade de sêmen com relação aos parâmetros de motilidade, integridade de membrana e acrossoma, após a descongelação e TTR de 5 horas. Após a seleção dos carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen, foi realizada a caracterização do perfil proteico do plasma seminal destes animais.

Todos os procedimentos descritos no trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

4.2 Coleta e Avaliação de Sêmen

Foram utilizados 18 reprodutores da raça Santa Inês com idades variando entre 1 e 3 anos, pesando em média 75 kg, todos em boa condição corporal. As coletas de sêmen ocorreram com intervalos mínimos entre 2 e 3 dias pelo método de vagina artificial. O sêmen fresco foi submetido à avaliação de motilidade total subjetiva, concentração espermática, volume, densidade, integridade de membrana e integridade de acrossoma. As avaliações de motilidade foram realizadas em microscópio com contraste de fase, em aumento de 20x.

4.2.1 Integridade de Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probe®, Eugene, Oregon, EUA), conforme descrição de Harrison e Vickers (1990). Uma amostra de sêmen (10 µL) foi adicionada à solução de corante (40 µL) e incubada por 15 minutos em microtubo protegido da luz a 37°C. Uma alíquota de 10 µL de solução de corante com sêmen foi colocada em uma lâmina coberta com uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 395/420 nm excitação/emissão). Foram examinadas 200 células espermáticas por lâmina, sendo classificadas de acordo com a membrana espermática em: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça); membrana semi-lesada (presença de coloração verde e vermelha na cabeça); membrana lesada (presença de coloração vermelha na cabeça). Os percentuais de espermatozoides com membrana íntegra foram analisados.

4.2.2 Integridade de Acrossoma

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando uma conjugação de isoticianato de fluotresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut 57 agglutinin* –

PNA) e IP, como descrito por Klinc e Rath (2007). Amostra de sêmen (10 μ L) foi diluída em uma solução de corante (30 μ L) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 10 μ L de solução de corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. Foram examinadas 200 células espermáticas em microscópio de contraste de fase e microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão). Os espermatozoides foram classificados em quatro categorias: morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma); morto com acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e acrossoma); vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma).

4.2.3 Criopreservação de Sêmen

Imediatamente após esses procedimentos, as palhetas foram submetidas à refrigeração em um refrigerador doméstico (Consul Compacto 120), a $\pm 5^{\circ}\text{C}$, por 120 minutos, para, então, serem transferidas para uma caixa de polietileno (isopor) contendo nitrogênio líquido, permanecendo por 20 minutos em vapor de nitrogênio a uma temperatura próxima de -120°C , a uma distância de quatro cm do nitrogênio. Posteriormente, foram mergulhadas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196°C .

Para criopreservação, procedeu-se à diluição do sêmen em meio diluidor Tris-Gema (Evans & Maxwell, 1990). O sêmen foi ajustado junto ao meio obtendo-se um total de 100×10^6 espermatozoides por dose envazado em palhetas de 0,25ml.

4.2.4 Descongelamento de Sêmen e Teste de Termo Resistência

O sêmen foi descongelado a 37°C e incubado na mesma temperatura, em banho-maria, durante 5 horas após a descongelamento (Panganini Filho, 1999). As avaliações descritas acima foram realizadas no momento da descongelamento (HORA 0) e no momento (HORA 5) após a descongelamento.

4.2.5 Avaliação de Sêmen Descongelado

O sêmen criopreservado foi avaliado quanto à motilidade subjetiva, integridade de membrana e integridade de acrossoma com os mesmos métodos descritos analisados no sêmen fresco. Também se utilizou a cinética espermática pelo CASA com o uso do aparelho modelo *Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences*, previamente ajustado (*setup-RAM*) para análise de sêmen ovino. Também foi analisada a resistência do sêmen pelo método de TTR por um período de 5 horas após a descongelação.

4.2.5 Avaliação da Cinética Espermática

O sêmen foi diluído em um meio X-Cell[®], mantendo uma concentração final de aproximadamente 48×10^6 espermatozoides/mL (Davis et al., 1992) em seguida 6 μ L do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler[®] aquecida a 37°C e submetida à análise computadorizada da cinética espermática, onde foram avaliados em três campos selecionados aleatoriamente, os seguintes parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto (μ m/s; VAP), velocidade retilínea (μ m/s; VSL), velocidade curvilínea (μ m/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (μ m; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF), retilinealidade (%STR) e linearidade (%; LIN). O setup utilizado foi o; Analysis setup RAM.

4.2.7 Avaliação da Fertilidade

Foi realizada uma estação de monta por um período de 20 dias utilizando-se carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen. Foram utilizadas 35 fêmeas para cada

carneiro. Após 35 dias do término da estação de monta foi realizada a ultrassonografia para diagnóstico de prenhez.

4.2.8 Amostras de Plasma Seminal para Análise Proteômica

As amostras de sêmen fresco foram submetidas a centrifugação a 6.000g, por 10 minutos para separação do plasma seminal e espermatozoides. O sobrenadante contendo o plasma seminal foi transferido para novo tubo e novamente centrifugado com a mesma velocidade e tempo. Após a segunda centrifugação, o plasma seminal foi acondicionado em microtubos, identificados e mantidos a -80°C.

No momento da preparação dos géis, as amostras de plasma seminal foram descongeladas à temperatura ambiente (aproximadamente +25°C), e submetidas a uma nova centrifugação a 10.000 g a +4°C por 30 minutos para a retirada de debris e possíveis espermatozoides ainda existentes. As amostras foram aliqüotadas em volumes de 100 µL, acondicionadas em microtubos de 0,6 mL e mantidas a -80°C.

4.2.9 Análise de Proteínas por Eletroforese Bidimensional

As amostras de plasma seminal foram submetidas à eletroforese bidimensional, de acordo com O' Farrel et al. (1975). Foram formados *pools* com as 7 partidas coletadas de cada animal selecionado. A quantificação da concentração de proteína total no plasma seminal foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para caracterizar e comparar o perfil proteico, três géis bidimensionais foram obtidos dos animais selecionados. Para isso, tiras de gel de poliacrilamida (*Immobiline DryStrips*, 13 cm, pH 4–7) foram hidratadas com 280 µL de tampão de rehidratação contendo aproximadamente 400 µg de proteínas por 16 h. A primeira dimensão foi realizada em um sistema de eletroforese IPGPhor III (*GE Healthcare*), de acordo com o manual do fabricante (fase

1: 300 V, 2 mA, 5 W, 0:01 h; fase 2: 3500 V, 2 mA, 5 W, 1:30 h; fase 3: 3500 V, 2 mA, 5 W, 4:00 h). As tiras foram deixadas em tampão de equilíbrio (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 6 M Uréia; 30% Glicerol; 2% SDS; 1% azul de bromofenol) com 1 M DTT por 15 min, seguido por mais 15 min no mesmo tampão contendo 2,5% de iodoacetamida. A segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE usando géis de poliacrilamida a 15% e marcador de massa molecular “Benchmark Protein Ladder” (Invitrogen).

4.2.10 Análise de Imagem

As proteínas foram coradas com Coomassie Blue Coloidal e os géis, foram digitalizados com o Image Scanner III (GE Healthcare). Três géis de cada condição foram selecionados e utilizados para a análise de imagem no programa Image Master 2D Platinum version 7.05 (GE Healthcare). As proteínas foram automaticamente detectadas, seguido por edição manual para confirmar a detecção e eliminar possíveis artefatos da técnica. O alinhamento e a detecção de proteínas foram checados manualmente. As proteínas foram aceitas como sendo diferencialmente expressas, quando as diferenças foram significativas pelo teste *t*-Student com um nível de significância de 95%. A análise de imagem foi realizada levando em consideração a reprodutibilidade e somente proteínas presentes em duas das três replicatas foram consideradas para análise de expressão diferencial.

4.2.11 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massa

Os fragmentos do gel, contendo as proteínas diferencialmente expressas, foram lavados por 15 min em acetonitrila a 50% e 25 mM bicarbonato de amônio e então desidratadas com acetonitrila a 100% por 10 min. Esses fragmentos foram reidratados em 15 µL de solução de tripsina 0,1 µg/µL (trypsin Sequencing Grade, Promega) preparada em 50 mM NH₄HCO₃ e incubada a 37° C por 22 h. Após a digestão, 1 µL desta solução foi misturada com 1 µL de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em acetonitrila a 50% e ácido trifluoracético a 0,1%) e aplicada manualmente na placa de MALDI (Bruker Daltonics). Os peptídeos foram analisados em espectrometro de massa UltraFlex III ou Auto-Flex Speed MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics) operado em modos refletor positivo (MS) e LIFTTM (MS/MS).

As listas dos picos representativos dos peptídeos trípticos foram geradas pelo programa FlexAnalysis 3.3 (BrukerDaltonics). Todas as listas de picos correspondentes a MS e MS/MS foram individualmente confrontadas com o sistema de buscas MASCOT (Matrix Science, UK) através do banco de dados de proteínas de mamíferos (taxonomia) do NCBIInr . A tolerância de massa usada nas buscas foi de 150 ppm e apenas a perda de uma clivagem foi permitida. Modificações fixas e variáveis foram definidas como carbamidometilação de resíduos de cisteína e oxidação de resíduos de metionina, respectivamente. O valor de corte para a probabilidade baseada em pontuação MOWSE, calculada pelo MASCOT (com $p < 0.05$), foi usado para aceitar a identificação. Para os dados de MS/MS, a tolerância peptídica foi de 150 ppm e a tolerância de massa de íons igual a 0.6 Da, apenas uma perda de clivagem foi permitida e fragmentos ionizados com carga igual a +1 foram considerados.

Quando o pI e a massa molecular das proteínas correspondentes não estavam disponíveis, esses valores foram calculados através da ferramenta ‘Compute pI/Mw’ do portal Ex-PASy (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

4.3 Análise Estatística

Para a análise dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco, descongelado e após o TTR, utilizou-se estatística descritiva dos dados, calculando-se média e desvio-padrão, seguida de análise de variância utilizando-se o procedimento GLIMMIX, sendo a comparação das médias feita pelo teste de Tukey corrigido para comparações múltiplas. Foi utilizado o programa SAS enterprise 5.1. A taxa de prenhez foi comparada pelo teste (Qui-quadrado).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliações do Sêmen dos Carneiros Quanto à Resistência à Criopreservação

Na avaliação do sêmen fresco não foi observada diferença ($P>0,05$) em nenhum dos parâmetros analisados entre os dois carneiros. Da mesma forma, para a avaliação da fertilidade em monta natural não houve diferença ($P>0,05$) entre os dois carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen (82,85% e 77,14% respectivamente) para a fertilidade (Figura 2.1).

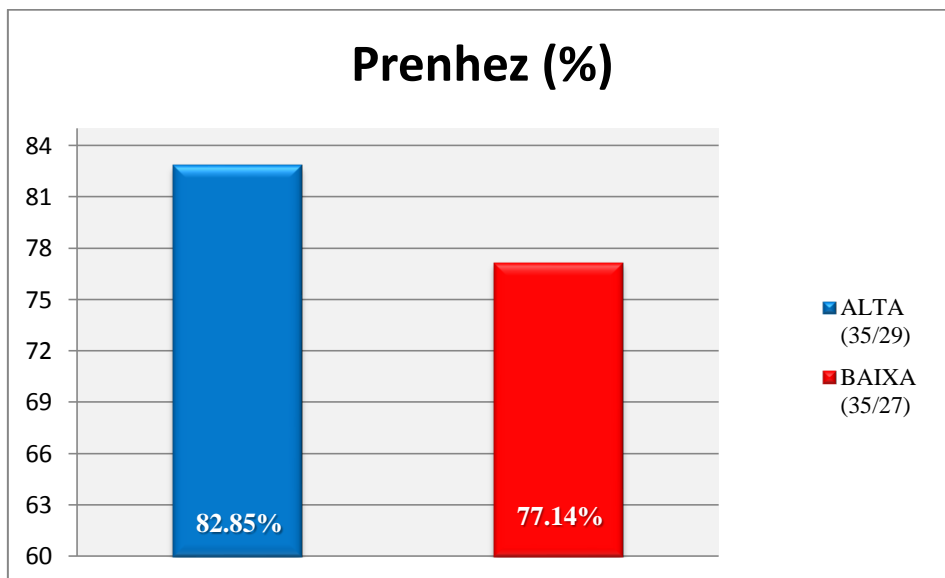


Figura 2.1. Resultado da prenhez após monta natural. Carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen.

Entretanto, após a descongelação (HORA 0), houve diferença ($P<0,05$) entre os carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen nos parâmetros de motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva, membrana íntegra, vivo com acrossoma íntegro, VAP, VSL, VCL, demonstrando a superioridade do carneiro 1 (Tabela 2.1).

Nos parâmetros avaliados no TTR (HORA 5), o carneiro de alta congelabilidade de sêmen se mostrou superior ($P<0,05$) na motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva, membrana íntegra, vivo com acrossoma íntegro, VAP, VSL e VCL em relação ao carneiro de baixa congelabilidade de sêmen (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, vivo acrossoma íntegro, velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL). Após a descongelação (HORA 0) e TTR (HORA5). Para os carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen e carneiro 18 de baixa congelabilidade de sêmen.

Parâmetros	HORA 0		HORA 5	
	Carneiro 1	Carneiro 18	Carneiro 1	Carneiro 18
	ALTA	BAIXA	ALTA	BAIXA
Motilidade Subjetiva	77,50 \pm 5,4 ^a	26,25 \pm 9,6 ^b	69,46 \pm 6,2 ^a	13,39 \pm 5,0 ^b
Motilidade Total	79,46 \pm 6,6 ^a	25,46 \pm 9,3 ^b	72,25 \pm 7,9 ^a	13,50 \pm 4,5 ^b
Motilidade Progressiva	54,89 \pm 5,3 ^a	16,28 \pm 7,4 ^b	46,71 \pm 5,1 ^a	7,89 \pm 3,7 ^b
Membrana Íntegra	52,96 \pm 4,9 ^a	19,92 \pm 6,3 ^b	47,46 \pm 4,6 ^a	10,89 \pm 4,8 ^b
Vivo com Acrossoma Íntegro	52,60 \pm 4,8 ^a	19,71 \pm 7,4 ^b	45,64 \pm 4,4 ^a	9,57 \pm 4,2 ^b
VAP	127,18 \pm 5,7 ^a	101,23 \pm 5,8 ^b	108,96 \pm 6,1 ^a	78,11 \pm 9,9 ^b
VSL	108,07 \pm 4,7 ^a	90,21 \pm 7,3 ^b	90,75 \pm 8,2 ^a	69,23 \pm 7,4 ^b
VCL	221,71 \pm 4,5 ^a	176,23 \pm 8,9 ^b	176,17 \pm 14,9 ^a	131,14 \pm 10,9 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p<0,05$).

5.2 Determinação do Perfil Proteico do Sêmen dos Animais Contrastantes Quanto à Resistência a Criopreservação

Neste estudo, apenas um dos carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen foram utilizados para a avaliação do perfil protéico. O carneiro de alta congelabilidade de sêmen foi identificado como carneiro 1 e o carneiro de baixa congelabilidade de sêmen foi identificado como carneiro 18. A análise do perfil protéico do plasma seminal dos carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen revelaram aproximadamente 314 *spots* por gel (Figura 2.2 e Figura 2.3), para cada animal analisado. Foi verificado um total de 97 *spots* diferenças, estatisticamente validados sendo 14 *spots* exclusivos do carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen, 60 *spots* aumentados e 30 *spots* diminuídos em relação ao carneiro 18 de baixa congelabilidade de sêmen. Já o carneiro 18 de baixa congelabilidade de sêmen apresentou 4 *spots* exclusivos (Figura 2.4).

Foi possível excisar 49 *spots* para identificação das proteínas sendo que 23 *spots* foram identificados com sucesso, obtendo-se assim uma porcentagem de 46,94% de proteínas identificadas (Quadro 2.1).

Um total de 20 proteínas foram identificadas no carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen sendo 10 aumentadas, 3 diminuídas e 10 exclusivas deste carneiro.

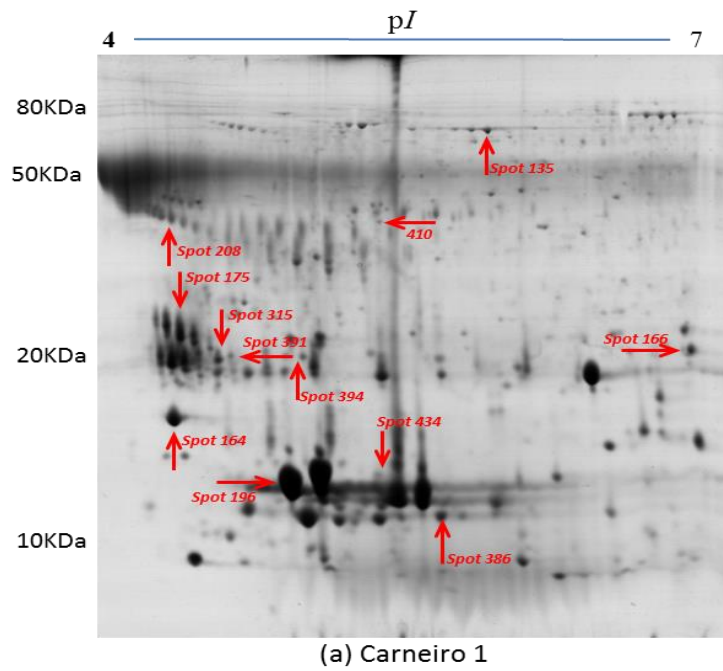


Figura 2.2. Gel representativos do plasma seminal do carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen. As setas indicam as proteínas identificadas com número do *spot* de acordo com a tabela 2.

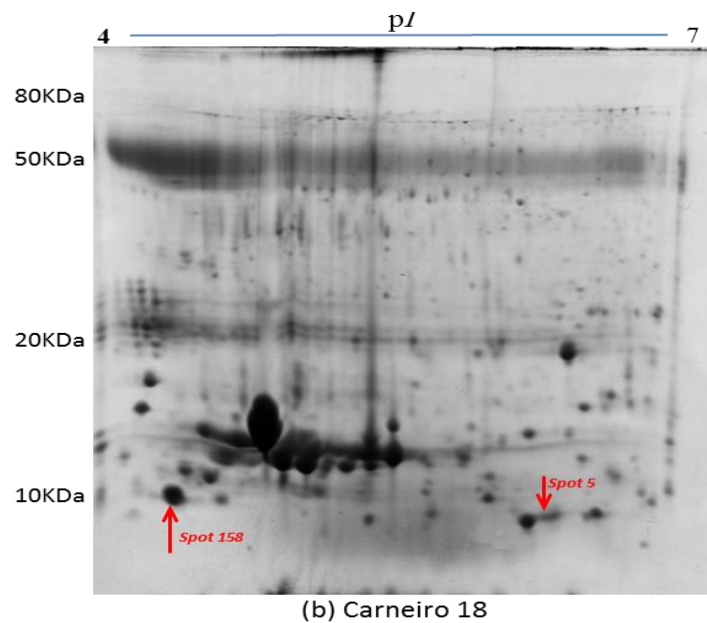


Figura 2.3. Gel representativo do plasma seminal do carneiro 18 de baixa congelabilidade de sêmen. As setas indicam as proteínas identificadas com número do *spot* de acordo com a quadro 2.1.

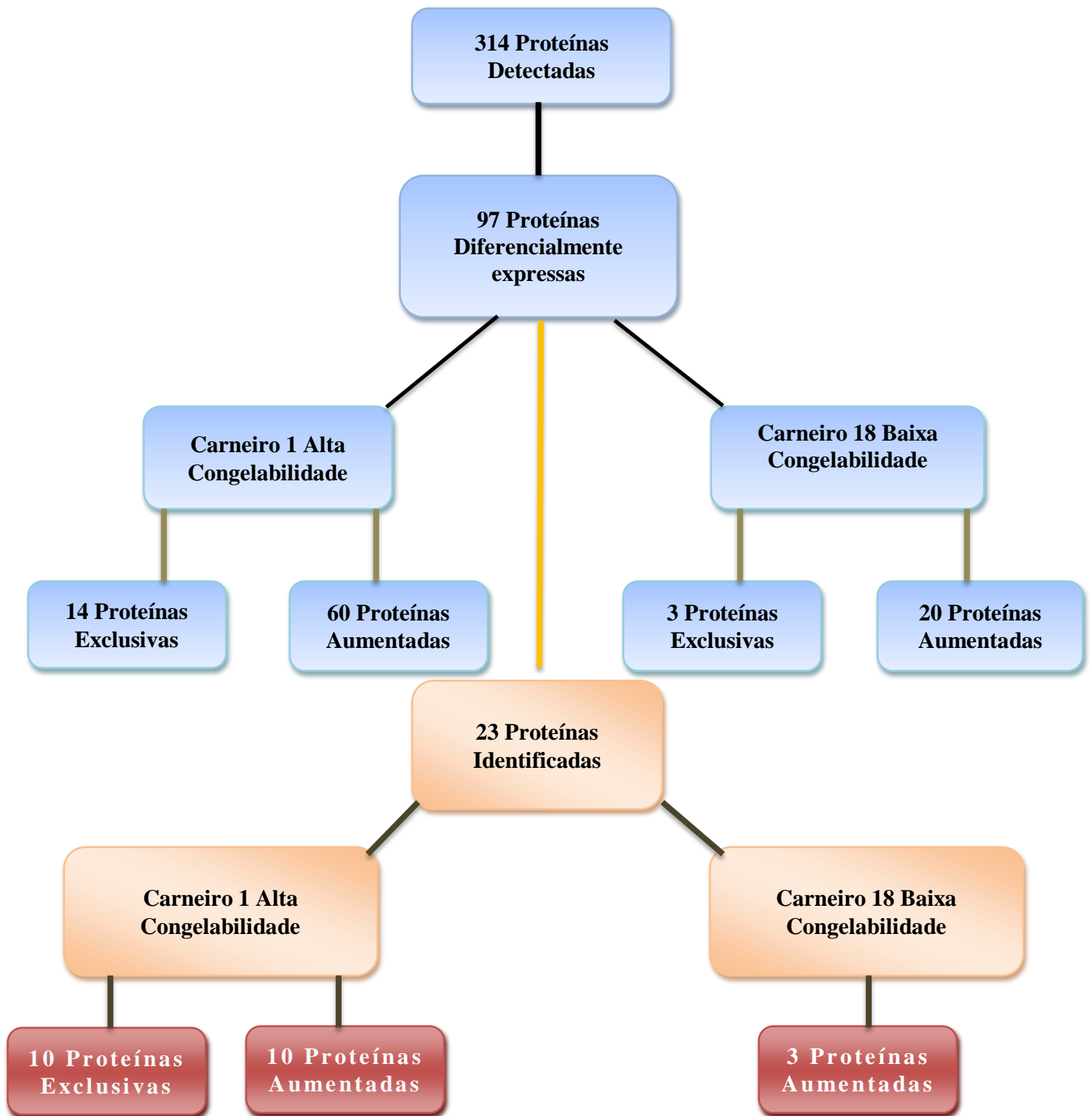


Figura 2.4. Fluxograma mostrando o total de proteínas encontradas nos carneiros de alta e baixa congelabilidade, proteínas diferencialmente expressas e identificadas.

Quadro 2.1. Proteínas diferencialmente expressas identificadas por espectrometria de massa.

Número <i>Spot</i>	Organismo	Proteína Identificada	Acesso (NCBIInr)	Expressão
5	Ovino	Espermadesina Z13	gi 426253214	-2.66
113	Ovino	UPF0762 protein C6orf58 homolog	gi 426235151	+2.41
135	Ovino	Serum Albumin precursor	gi 57164373	+2.92
158	Caprino	Bodesina 2 Serum Albumin precursor	gi 121484235	-1.65
164	Ovino	Lipocalina	gi 426225939	+2.06
166	Ovino	Glutathione Peroxidase	gi 392583910	+1.73
175	Ovino	RSVP20	gi 148225308	+2.82
196	Ovino	RSVP14	gi 219521810	+2.09
208	Ovino	Clusterina	gi 426220555	+7.47
220	Ovino	Inibidor Anidrase Carbônica	gi 426218286	+3.62
223	Ovino	Beta-microseminoprotein	gi 426255960	-4.23
315	Ovino	RSVP20	gi 148225308	+17.18
316	Ovino	Inibidor protease submandibular	gi 426231083	+31.67
386	Ovino	RSVP14	gi 219521810	Exclusiva
391	Ovino	RSVP20	gi 148225308	Exclusiva
394	Ovino	RSVP20	gi 148225308	Exclusiva
404	Ovino	Imunoglobulina Gama	gi 388235	Exclusiva
410	Ovino	Clusterina	gi 426220555	Exclusiva
418	Ovino	Inibidor Anidrase Carbônica	gi 426218286	Exclusiva
419	Ovino	Beta-microseminoprotein	gi 426255960	Exclusiva
427	Ovino	UPF0762 protein C6orf58 homolog	gi 426235151	Exclusiva
434	Ovino	RSVP14	gi 219521810	Exclusiva
443	Ovino	Inibidor protease submandibular	gi 426231083	Exclusiva

6 DISCUSSÃO

No carneiro, alguns aspectos do processo de resfrieração-congelação-descongelação tornam a membrana espermática com maturação excessiva e aumenta a proporção de espermatozoides capacitados e acrossoma reagidos precocemente. Essas mudanças encurtam a sobrevivência espermática, levando a perda da fertilidade, ou a incapacidade de fertilizar (Salamon et al., 1995; Holt, 2000).

Com relação aos carneiros selecionados, ficou evidente que há um efeito individual com relação à qualidade do sêmen congelado, pois não houve diferença entre o carneiro de alta congelabilidade de sêmen e o carneiro de baixa congelabilidade de sêmen nos parâmetros avaliados no sêmen fresco e na fertilidade testada em monta natural. Este fator representa um problema frequente para a indústria de preservação de sêmen. Independente da qualidade do sêmen, após a coleta e fertilidade a campo, o sêmen de alguns indivíduos são consistentemente criopreservados com menos crioinjúrias em relação a outros indivíduos (Watson, 1995; Holt et al. 2000).

O efeito da criopreservação é bem marcante quando os carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen são comparados, após a descongelação e no TTR (HORA 5). Estes resultados podem estar relacionados à variação individual de cada animal, a habilidade do sêmen em resistir a congelação e descongelação, variações entre indivíduos e até mesmo entre ejaculados (Watson et al., 2000, Peris et al., 2004). A redução desta variabilidade é um dos mais importantes desafios do processo de criopreservação de sêmen.

Como sugerido por diversas pesquisas que o plasma seminal pode influenciar positivamente e negativamente na qualidade do sêmen e na fertilidade de machos, foi interessante observar que a comparação entre os carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen revelou

proteínas de grande relevância na funcionalidade dos espermatozoides. Entre as proteínas identificadas, pode-se destacar 4 proteínas exclusivas e 3 aumentadas no carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen. Essas proteínas foram identificadas como pertencentes à família *Binder of Sperm Proteins* (BSPs) identificadas também em ovinos como sendo *Ram Seminal Vesicles Protein* (RSVP). São proteínas secretadas pelas glândulas vesiculares de reprodutores ovinos (Fernandez-Juan et al., 2006) com 14 e 20 kDa e denominadas como RSVP14 e RSVP20, respectivamente. Apesar da RSVP14 e RSVP20 serem semelhantes em suas funções, o estudo comparativo de suas sequências de aminoácidos mostra que de fato tratam-se de proteínas diferentes (Barrios et al., 2005). A sequência de aminoácidos da RSVP14 apresenta grande homologia com a proteína do plasma seminal bovino BSP-A1/A2. Seus homólogos constituem um grupo de proteínas conservadas, podendo conter múltiplas isoformas (Manjunath et al., 2009).

A proteína RSVP14 foi identificada em 2 *spots* exclusivos e em 1 *spot* aumentando, já a proteína RSVP20 foi identificada em 2 *spots* exclusivos e em 2 *spots* aumentados. Essas proteínas são absorvidas pelos os espermatozoides, trazendo uma maior estabilidade a membrana espermática, desta forma aumentando sua resistência aos danos causados pelo choque térmico, preservando a integridade de membrana (Barrios et al., 2005; Fernandez-Juan et al., 2006).

No carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen, observou-se uma maior resistência a criopreservação do sêmen, que pode estar relacionada a uma maior expressão das proteínas RSVP14 e RSVP20 encontrada nesse carneiro.

Cardozo et al. (2006) observaram durante a estação reprodutiva uma maior viabilidade espermática em relação a estação não reprodutiva e uma maior expressão das proteínas RSVP14 e RSVP20 na estação reprodutiva, demonstrando que essas proteínas exercem um efeito protetor ao espermatozoide. Estudos anteriores demonstraram que estas proteínas adicionadas ao sêmen revertem alterações na membrana espermática induzidas pelo choque frio, promovendo maior integridade da membrana plasmática e acrossomal (Barrios et al., 2000; Peres-Pe et al., 2001) na motilidade e viabilidade (Leahy et al., 2010; Bernardini et al., 2011).

Outra proteína identificada e aumentada no carneiro de alta congelabilidade de sêmen foi a *Epididymal secretory glutathion peroxidase*. A glutathion peroxidase (GSHPx) constitui um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática, e está presente no epidídimo e nos espermatozoides em diversas espécies e pode se ligar a membrana do espermatozoide (Perry et

al., 1992; Dacheux et al., 2005). A GSHPx pode ser considerada como uma enzima antioxidante, podendo atuar no combate ao excesso das espécies reativas de oxigênio (EROS). Os espermatozoides tendem produzir EROS, e sua produção em excesso pode causar danos na função espermática e infertilidade (Nich et al., 2006). A produção excessiva de EROS pode ser letal ao espermatozoide. No meio externo, o espermatozoide é protegido pelo plasma seminal que contém redutores de ROS. A GSHPx é particularmente importante na proteção do espermatozoide (Dacheux et al., 2005).

Trabalhos com adição de GSHPx no sêmen ou no meio de criopreservação demonstraram uma melhor motilidade, maior conservação do sêmen, redução de danos a membrana plasmática (Sarlos et al., 2002). Desta forma, a GSHPx pode estar amenizando os efeitos de EROS e melhorando a qualidade do sêmen criopreservado do carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen.

A clusterina foi outra proteína identificada no carneiro de alta congelabilidade de sêmen, exclusiva em 1 *spot* e aumentada em outro *spot*. No trato reprodutivo, a clusterina foi encontrada na próstata, glândulas vesiculares, testículo, espermatozoides luminiais e epidídimo (Braundmeier, 2001). Algumas de suas funções incluem maturação espermática, metabolismo de lipídeos, remodelamento da membrana celular podendo inibir também a precipitação proteica induzida pelo estresse, protegendo as células dos efeitos citotóxicos desta precipitação participando na proteção das membranas celulares (Meri et al., 2001).

Segundo Jobim et al. 2004 a clusterina presente no plasma seminal apresenta uma correlação positiva com a congelabilidade de sêmen, observaram uma maior expressão dessa proteína em reprodutores de alta congelabilidade de sêmen. Sugerindo que clusterina exerce efeito protetor a membrana espermática reduzindo os danos durante a criopreservação. Baseado nos resultados deste trabalho é possível que esta proteína esteja exercendo efeito protetor a membrana espermática como foi visualizado na criopreservação do sêmen do carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen. Esta proteína pode apresentar função biológica semelhante para as BSP na proteção da membrana espermática no processo de criopreservação do sêmen (Jobim et al., 2003).

Outra proteína aumentada no carneiro 1 de alta congelabilidade de sêmen foi a albumina que possui a capacidade de absorver peróxidos de lipídeos contribuindo para um efeito protetor tanto na membrana quanto na motilidade espermática, tendo assim um poder antioxidante, protegendo o espermatozoide da ação de lipoperóxidos (Alvarez et al., 1995). Essa

proteína foi identificada em maior concentração em touros de alta congelabilidade. Sua adição ao sêmen resulta em um aumento da motilidade, correlação positiva entre o número de espermatozoides normais em bovinos (Jobim et al., 2004). Da mesma forma foram encontrados em nosso trabalho onde a albumina estava aumentada no carneiro de alta congelabilidade de sêmen.

A lipocalina pode corresponder a prostaglandina D sintetase, com 26kDa, que é uma das principais proteínas encontrada no epidídimo de ovinos, podendo estar envolvida na maturação espermática. Esta proteína foi relacionada a alta fertilidade de reprodutores bovinos (Killian et al., 1993). Mas seu papel é contraditório, três isoformas dessa proteína apresentaram maior expressão em touros de baixa fertilidade (Moura et al., 2006).

Já Fouchecourt et al., (2002) observaram que grande quantidade dessa proteína, no trato genital, não são essenciais para função reprodutiva e que outras proteínas podem assumir sua função, quando a concentração desta proteína é baixa. Nosso estudo mostrou uma maior expressão dessa proteína no plasma seminal do carneiro de alta congelabilidade de sêmen.

No carneiro de baixa congelabilidade de sêmen identificamos a proteína espermadensina Z13 com maior expressão em relação ao carneiro de alta congelabilidade de sêmen. A espermadenzina Z13 possui em sua sequência de aminoácidos semelhança com a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP). Esta proteína também apresenta semelhança de homologia com inibidores de motilidade espermática (SPMI) encontrada no plasma seminal de humanos e de suínos (Tedeschi et al., 2000; Moura et al., 2006). Similarmente em nosso estudo a maior expressão dessa proteína no carneiro de baixa congelabilidade de sêmen, parece estar relacionada a baixos índices de motilidade e integridade de membrana observada no sêmen deste animal.

Killian et al., (1993) observaram um peptídeo de baixo peso molecular mais abundante no plasma seminal de reprodutores de baixa fertilidade. Moura et al., (2006) verificaram maior intensidade da proteína espermadensina Z13 no fluido das glândulas acessórias dos reprodutores bovinos de baixa fertilidade. Essa proteína apresenta uma relação inversa com a fertilidade, chamada por alguns pesquisadores de fator antifertilidade.

A proteína bodesina 2 foi identificada no carneiro de baixa congelabilidade de sêmen. O possível papel fisiológico reprodutivo destas proteínas ainda não está bem estudado. Na espécie caprina, Teixeira et al (2002) isolou e sequenciou o N-terminal da proteína de 12,59 KDa de massa molecular, proveniente do seu plasma seminal, denominada BSFP (*Buck seminal fluid*

protein) e sua purificação. Esta proteína foi caracterizada como a primeira espermedesina caprina. Em ovinos a espermedesina se mostrou atividade ligante a heparina. Isto sugere que esta proteína apresenta um papel similar na capacitação espermática ou ligação do espermatozóide no epitélio ovidutal ou a zona pelúcida (Bergeron et al., 2005).

Nesse estudo observou-se uma baixa resistência a criopreservação do carneiro 18 para os parâmetros avaliados. A proteína bodesina identificada com maior expressão no carneiro de baixa congelabilidade de sêmen pode estar influenciando a resistência à criopreservação desse carneiro.

6. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciam a existência de carneiros de alta e baixa congelabilidade de sêmen, e que algumas proteínas estão diretamente relacionadas com essa qualidade do sêmen criopreservado. As proteínas candidatas para alta congelabilidade são as RSVP14, RSVP20, clusterina, albumina e glutathione peroxidase. Proteínas candidatas a baixa congelabilidade de sêmen são as espermadesina Z13 e possivelmente a bodesina 2. Outros estudos devem ser realizados com expressivo número de carneiros para validação dessas proteínas como marcadores para melhor conhecimento das capacidades de resistência do sêmen à criopreservação.

7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e CNPq pela bolsa de estudo, ao CNPq pelo suporte financeiro.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, J. E.; HOPPE, H.; Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v.46, p.791-797, 1996.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.42, 585 334-346, 1995.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.72, p.175-183, 2002.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v.63, p.1531-1537, 2000.

BARRIOS, B.; FERNANDEZ-JUAN, M.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, 588–595, 2005.

BARTH, A. D. OKO, R. J. Normal Bovine Spermatogenesis and Sperm Maturation. In: BARTH, A. D., OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**, Ames, Iowa State University, 1989.

BENNET, J.P. Microeletrophoresis of bull, ram, boar & rabbit seminal plasma proteins. In: **Atti del V° Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale** (Trento, Italia). pp.186-189, 1964.

BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, M.W; FORNES, R.H.,; ALBERIO, A.,; CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, p. 436-447, 2011.

BERGERON A, VILLEMURE M, LAZURE C, MANJUNATH P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Mol Reprod Dev.** 71:461-470, 2005.

BERGMANN, J. A. G.; PENNA, V. M. O impacto de novas biotecnias em programas de melhoramento animal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.27, n.1, supl., p.110-132, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B. e FAYER-HOSKEN, R.A. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**. v.52, p.863-873, 1999.

BRAUNDMEIER, A.G., MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.84, p.1915-1925, 2001.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T. Identification of rsvp14 and rsvp20 components by two-dimensional electrophoresis and western-blotting. **Reproduction in Domestic Animals**, v 43, p. 15-21 2008.

CARDOZO, J.A.; GRASA, P.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN, J. A. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. **Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v 10 p. 51-59, 2009.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. **Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga.** 186p, 2005.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biociência**, v.36, p.40-46, 2006.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

DACHEUX, J.L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, p.319–341, 2005.

DAVIS, R.O.; ROTHMANN, S.A.; OVERSTREET, M.D. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. **Fertility and Sterility**, V.57, n.3, p.648-653, 1992.

DIDION, B.A., DOBRINSKY, J.R., GILES, J.R., GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22 (1): p. 51-57, 1989.

DOMINGUEZ, M.P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R.H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**. 69, 564-573, 2008.

DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., KUMMEN, E. *et al.* Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.359-368, 2004.

EPPLESTON, J., MAXWELL, W. M. C. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix. **Wool Tech. Sheep Breed.** Kensington, v.41, p.291-302, 1993.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats.** Sidney: Butterworths, 1987. 194 p.

FERNÁNDEZ-JUAN, M. *et al.* Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p.721-732, 2006.

FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A.; PŁUCIENNICZAK, G.; KOTŁOWSKA, M.; KORDAN, W.; WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.; STRZEŻEK, J. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reproductive Biology**, v.6, p.5-20, 2006.

FOUCHECOURT S, METAYER S, LOCATELLI A, DACHEUX F, DACHEUX J. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. **Biol Reprod**, 62:1790-1803, 2000.

GARDE, J.; GUTIÉRREZ, A.; ARTIGA, C. G.; VÁZQUEZ, I. Influence of freezing process on in vitro capacitation of ram semen. **Theriogenology**, v.39, p.225, 1993.

GATTI, J.L. *et al.* A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. **Biology of Reproduction**, Madison, v.60, p.937-945, 1999.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p.481-487, 1997.

GILLAN, L.; SKOVGOLD, K.; WATSON, P. F.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v.11, p.309-315, 1999.

GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 447-454, 2004.

HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., SHARPE, P., BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.

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

HENAULT, M. A., KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterogonous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zone-free bovine oocytes. **J. Reprod. Fert.**, v. 108, p. 199 – 204, 1996.

HE, L; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**, v.64, p.69-70, 2001.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, London, v. 53, p. 47-58, 2000.

KILLIAN, G. J., CHAPMAN, D. A., ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**, v.49, p. 1202-1207, 1993.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 63-67, 2007.

JAMES, P. Genomes and proteomes. **Biochemistry Biophysics Research Community**, v.3, 231 p. 1-6. 1997.

JOBIM, M. I. M. ; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; MATTOS, R.C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do semen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, RS, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, 255-266, 2004

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P.; MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.63, p.2053-2062, 2005.

LAUSMANN, C. V., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D., *et al.* Plasma seminal na capacitação espermiática em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**,v.28, n.3. p.150-157, 2004.

LEAHY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.: Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. **Anim Reprod Sci.** 119, 47–153. 2010.

LOPEZ, M. F., Proteome analysis. Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B. Biomedical Science**, v. 5; p. 191-202. 1999.

MANJUNATH, P; LEFEBVRE, J; JOIS, P.S; FAN, J; WRIGHT, M.W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.80, p.394–397, 2009.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MAXWELL, W. M. C., EVANS, G., MORTIMER, S. T. *et al.* Normal fertility in ewes after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, Sydney, v.11, p.123-126, 1999.

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

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, London, p.1-7, 2001.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN GJ. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, p.201–211, 2006.

NASS, S.J.; MILLER, D.J.; WINER, M.A. e AX, R.L. Male accessory Sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular and Reproduction Development**, v.25, p.237-246, 1990.

NICHI, M. MILLER, D.J.; JARVA, H. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, Amsterdam, v.66, p.822-828, 2006.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reprod. Fertil. Dev.** Zaragoza, v.9, p. 381-390, 1997.

PÉREZ, L. J., VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., *et al.* The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, Buenos Aires, v.47, p.549-558, 1996.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v.56, p.425-434, 2001.

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitate sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Jornaul. Andrology**. 25, 224–233, 2004.

PERRY, A.C. et al. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. **The Biochemical Journal**, London, v. 285, p. 863-870, 1992.

RÊGO, J.P.A.; Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos. Dissertação (Mestrado) – **Universidade federal do Ceará** - Centro de ciências agrárias departamento de zootecnia - Programa de pós-graduação em zootecnia. 106p, 2010.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.36, 1999.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.62, p.77-111, 2000.

SARLOS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M. GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.

SILVA, T. A. S. N., NEVES, J.P., BRAGANÇA, J. M., GONÇALVES, P.B.D., RUMPF, R. Uso do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino para inseminação transcervical em ovelhas com estro sincronizado. **Anais da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – XIX SBTE** Angra dos Reis, 2005.

SOUZA, C. E. A. et al. Reproductive development of Santa Ines rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animal**, Malden, v.45, p.644–653, 2010.

TEDESCHI G, OUNGRE E, MORTARINO M, NEGRI A, MAFFEO G, RONCHI S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal Biochem**, v.267, p.6175-6179, 2000.

TEIXEIRA, D. I. A. Isolation and partial characterization of a protein from Buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. **Protein and Peptide Letters**, Sharjah, v.9, p.331-335, 2002.

VALCÁRCEL, A.; De Las HERAS, M. A.; PERÉZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489, 1994.

VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299-309, 1997.

WOLF, D.F., BRADLEY, J.T. & RIDDEL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083-1091, 1993.

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

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

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide for methods and applications of DNA and protein separations**. 2. Ed., Weinheim: VHC. 1997.

CAPÍTULO 3

A ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS DE ALTA CONGELABILIDADE DE SÊMEN MELHORA A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA DE CARNEIROS DE BAIXA CONGELABILIDADE DE SÊMEN

Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva^a, Mauricio Machain^b, Bianca Damiani Marques Silva^b, Alexandre Floriani Ramos^b, Jairo Pereira Neves^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brasil;

^bEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil;

1 RESUMO

O plasma seminal pode exercer efeito protetor quando adicionado ao sêmen descongelado. Pouco se sabe sobre seu efeito na adição após a coleta do sêmen e se o plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade de sêmen pode incrementar o sêmen criopreservado de carneiros de baixa congelabilidade de sêmen. O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição do plasma seminal de carneiro com sêmen de alta congelabilidade, no sêmen de carneiros de baixa congelabilidade de sêmen, antes do processo de criopreservação, quanto a forma de adição do plasma seminal (experimento 1), quanto concentração de plasmas seminal em relação ao sêmen (experimento 2) e a forma de obtenção do plasma seminal (experimento 3). Foram utilizados 4 carneiros de baixa congelabilidade de sêmen como doadores de sêmen e 2 carneiros com sêmen de alta congelabilidade como doares de plasma seminal, nos três experimentos. Avaliou-se a motilidade, integridade de membrana e a cinética espermática após a descongelação e TTR. Para os três experimentos se observou uma melhoria ($P<0,05$) na qualidade do sêmen quando adicionado o plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade ao sêmen dos carneiros de baixa congelabilidade. Os resultados mostram que a forma de adicionar o plasma seminal pode influenciar na qualidade do sêmen, sugerindo que a melhor forma de adição é no meio de pré-diluição. Com relação à concentração de plasma seminal utilizado, qualquer concentração pode ser utilizada trazendo benefícios ao sêmen criopreservado e para a forma de obtenção do plasma seminal, o plasma seminal de carneiro vasectomizado se mostrou ($P<0,05$) superior ao plasma seminal de carneiro inteiro. Desta forma a adição de plasma seminal antes do processo de criopreservação pode melhorar a resistência aos danos causados no sêmen ovino criopreservado.

Palavras-chave: adição, congelabilidade, criopreservação, ovino, plasma seminal, vasectomizado.

2 ABSTRACT

THE ADDITION OF SEMINAL PLASMA INCREASED THE RAM SEMEN CRYOPRESERVATION IN LOW FREEZABILITY RAMS

The seminal plasma can have a protection effect when added to thawed semen, a few is known about the effect of its addition after semen collection and if the ram seminal plasma of high freezability can increase the low freezability of ram semen cryopreserved. The aim of this work was to evaluate the addition of seminal plasma of high freezability ram in semen of low freezability ram, before the cryopreservation, as how seminal plasma was add (experiment1), as concentration of seminal plasma in relation to semen (experiment 2) and how the seminal plasma was obtain (experiment 3). Were use 4 rams of low freezability as semen donors and 2 rams of high freezability as seminal plasma donors, in the three experiments. Was evaluate motility, membrane integrity and kinetic sperm after thawed semen and TRT. To the three experiments had improve ($P<0.05$) at semen quality when added the seminal plasma of high freezability ram to semen of low freezability ram. The results showed that the way of how add the seminal plasma can influence at semen quality, suggesting that the best form of addition is in the pre-dilution extender. In relation with concentration of seminal plasma used, any concentration can be used bringing benefits to cryopreserved semen and to how seminal plasma was obtain, the seminal plasma of vasectomized ram was superior ($P<0.05$) than seminal plasma of whole ram. So the addition of seminal plasma before the cryopreservation process can improve the resistance to the damages caused in cryopreserved ram semen.

Key-words: seminal plasma, cryopreservation, semen, addition, freezability.

3 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é vista como uma forma de beneficiar a reprodução de animais de importância genética. Esta biotécnica viabiliza maximizar o uso de reprodutores que apresentam boas características produtivas (Watson, 2000). Porém a criopreservação de sêmen acarreta uma série de alterações prejudiciais aos espermatozoides, resultando em diminuição marcante da sua capacidade fecundante. Os danos criogênicos na estrutura dos mesmos podem ser os responsáveis pelo decréscimo da sua integridade funcional, sobrevivência e capacidade de fertilização (Salamon & Maxwell, 1995).

Um problema de importância prática na indústria de criopreservação de sêmen ovino é a existência de animais denominados de alta e baixa congelabilidade. Independentemente da boa qualidade seminal *in natura* e de bons resultados de prenhez com monta natural, alguns animais apresentam maior sensibilidade à criopreservação. No reprodutor ovino a manipulação do sêmen e o processo de refrigeração, congelação e descongelação causa modificações bioquímicas, funcionais e da estrutura da membrana plasmática, causando um aumento de espermatozoides com membrana espermática lesada e ainda aumento da proporção de espermatozoides capacitados e com acrossoma reagido precocemente (Salamon & Maxwell, 1995; Holt, 2000).

A exploração do potencial da IA é significativo pela viabilização de uma técnica baseada na utilização de sêmen congelado, considerando que o uso de sêmen fresco é limitado pelo período restrito de viabilidade, curto período de estocagem e o aproveitamento limitado dos reprodutores (Evans & Maxwell, 1990).

Por outro lado, a IA com sêmen congelado viabiliza um melhor aproveitamento de reprodutores geneticamente superiores, porém os resultados obtidos pela aplicação cervical na espécie ovina não proporcionam atualmente uma taxa de prenhez satisfatória, seja pelo fato da cervix possuir anéis excêntricos dificultando a passagem do cateter de inseminação (Halbert et al., 1990), seja pelas alterações bioquímicas e moleculares das células submetidas a congelamento e descongelamento como também pela reduzida sobrevivência dos espermatozoides. Embora a deposição intrauterina, por laparoscopia, do sêmen congelado proporcione taxas de prenhez semelhantes às obtidas com sêmen fresco, o elevado custo desta técnica inviabiliza seu uso mais amplo (Evans & Maxwell, 1990).

Em busca de alternativas para aumentar a viabilidade espermática e fertilidade do sêmen congelado de reprodutores ovinos, alguns estudos vem sendo desenvolvidos com o plasma seminal desses reprodutores. O plasma seminal é uma secreção fisiológica das diversas glândulas do trato reprodutivo masculino, com um papel de grande importância na função fisiológica do espermatozoide (Kraus et al., 2005).

Diversos estudos demonstram a importância da adição do plasma seminal ao sêmen descongelado auxiliando favoravelmente na fertilidade, além de melhor viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do espermatozoide (Ollero et al., 1997; Maxwell & Johnson, 1999; Silva et al., 2005; Maxwell et al., 2007; El-Hajj et al., 2007; Leahy et al., 2010).

Na espécie ovina, alguns estudos têm relatado que proteínas no plasma seminal, que exercem efeito positivo sobre a capacitação espermática, motilidade espermática, integridade de membrana e acrosoma, agem promovendo uma proteção dos espermatozoides de reprodutores ovinos (Barrios et al., 2005; Fernández-juan et al., 2006; Cardozo et al., 2006).

Moura et al. (2010), verificaram a existência de *spots* proteicos do plasma seminal de carneiros com correlação positiva ou negativa com a integridade da membrana plasmática de espermatozoides criopreservados e observaram que essas diferentes proteínas poderiam atuar de maneira complementar na estabilidade da membrana e, conseqüentemente, na viabilidade e motilidade seminal.

Neste sentido o objetivo deste trabalho é observar se a adição de plasma seminal de reprodutores ovinos com sêmen de alta congelabilidade pode beneficiar o sêmen congelado dos reprodutores de baixa congelabilidade, quando adicionado antes da criopreservação do sêmen.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Foram realizados três procedimentos neste trabalho de modo que o resultado de um serviu de requisito para a etapa seguinte. As atividades foram ordenadas em experimentos denominados de 1, 2 e 3.

No experimento 1 analisou-se o efeito do método de adição do plasma seminal ao sêmen após a coleta. Este foi subdividido em quatro tratamentos:

T1 – Adição de plasma seminal diretamente ao sêmen logo após a coleta, na quantidade de 30% em relação ao volume de sêmen;

T2 – Adição de plasma seminal ao meio de criopreservação, na quantidade de 30% em relação ao volume de meio utilizado para a criopreservação;

T3 – Adição de plasma seminal no meio de pré-diluição, na quantidade de 30% em relação ao volume de meio de pré-diluição. Proporção de pré-diluição final foi de 1:1 (sêmen/meio de congelção).

T4 – Controle, sem adição de plasma seminal.

No experimento 2 avaliou-se o efeito da concentração de plasma seminal adicionado ao sêmen logo após a coleta. Estabeleceram-se quatro tratamentos:

T30 – Adição de 30% de plasma seminal no meio de pré-diluição;

T60 – Adição de 60% de plasma seminal no meio de pré-diluição.

T90 – Adição de 90% de plasma seminal no meio de pré-diluição;

T0 – Controle, sem adição de plasma seminal.

No experimento 3, verificou-se o efeito da adição de plasma seminal de reprodutores inteiros e vasectomizados ao sêmen após a coleta. Utilizaram-se três tratamentos:

VAS – Adição de 30% de plasma seminal de reprodutor vasectomizado no meio de pré-diluição;

INT – Adição de 30% de plasma seminal de reprodutores inteiros no meio de pré-diluição.

CONT – Controle, sem adição de plasma seminal.

Foram utilizados quatro reprodutores doadores de sêmen (baixa congelabilidade de sêmen) e dois reprodutores doadores de plasma seminal (alta congelabilidade de sêmen) da raça Santa Inês com idades entre um ano e três anos pesando em média 75 kg todos em boa condição corporal. Os reprodutores após um período de adaptação foram submetidos a um regime de coletas de sêmen e exames andrológicos conforme critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013). Os reprodutores aptos foram utilizados no experimento.

O plasma seminal foi obtido de dois reprodutores de alta congelabilidade de sêmen. Em duas formas:

- **PLASMA SEMINAL INTEIRO**. Após a coleta os ejaculados foram centrifugados e os espermatozoides foram separados do plasma seminal. Utilizou-se uma centrifugação a 700g, por 10 minutos o sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado; após a segunda centrifugação o plasma seminal foi armazenado em eppendorf e congelado. Foram realizadas varias coletas com intervalo de dois a três dias formando-se um banco denominado plasma seminal inteiro.

- **PLASMA SEMINAL VASECTOMIZADO**. Com a realização da vasectomia se obteve uma fração só de plasma seminal livre de espermatozoides. O plasma seminal foi centrifugado a 700g, por 10 minutos para retirada de debris, após a centrifugação eram armazenados em eppendorf e congelados formando um banco denominado de plasma seminal vasectomizado.

Os reprodutores doadores de sêmen e de plasma seminal foram os mesmos utilizados nos três experimentos. Todos os métodos citados a baixo foram realizados igualmente nos três experimentos.

Todos os procedimentos descritos no trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

4.2 Coleta e Avaliação de Sêmen

Cada reprodutor foi submetido a cinco coletas, as quais foram realizadas com intervalo de 2-3 dias durante o período experimental. Os ejaculados foram obtidos com vagina artificial, tendo como manequim uma fêmea em estro e analisados considerando os seguintes itens: coloração, aspecto, odor, volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática. Os ejaculados só foram aproveitados para a criopreservação quando apresentaram os seguintes padrões mínimos: volume de 0,5 ml, motilidade espermática de 70%, vigor 3 e concentração espermática de 3×10^9 spz/ml.

4.2.1 Avaliação do Sêmen Fresco

A motilidade foi avaliada em microscópio com contraste de fase em objetiva de 20x, três campos foram analisados e resultado determinado em percentagem de motilidade total subjetiva.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP) (*Molecular Probe®*, Eugene, Oregon, EUA), conforme descrição de Harrison e Vickers (1990). Uma amostra de sêmen (10 μ L) foi adicionada à solução de corante (40 μ L) e incubada por 15 minutos em microtubos protegidos da luz a +37°C. Uma alíquota de 10 μ L de solução de corante com sêmen foi colocada em uma lâmina coberta com uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 395/420 nm excitação/emissão). Foram examinadas 200 células por lâmina, sendo classificadas de acordo com a membrana espermática em: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça); membrana semi-lesada (presença de coloração verde e vermelha na cabeça); membrana lesada (presença de coloração vermelha na cabeça). Para fins de análise utilizaram-se os percentuais de espermatozoides com membrana íntegra.

4.2.2 Criopreservação de Sêmen

Para criopreservação, procedeu-se à diluição do sêmen em meio diluidor Tris-Gema (Evans e Maxwell, 1990), o sêmen foi diluído junto ao meio obtendo no final uma concentração de 100×10^6 espermatozoides por dose, e envasado em palhetas de 0,25ml. Cada método utilizado neste experimento está descrito no delineamento experimental. Após a coleta de sêmen foi realizado a pré-diluição na proporção de 1:1 (sêmen/diluidor). O diluidor utilizado na pré-diluição é o mesmo da criopreservação.

Imediatamente após esses procedimentos, as palhetas com sêmen/diluidor foram submetidas à refrigeração em refrigerador doméstico (Consul compacto 120), a $+5^{\circ}\text{C}$, por 120 minutos, para, então, serem transferidas para uma caixa de polietileno (isopor) contendo nitrogênio líquido, permanecendo por 20 minutos em vapor de nitrogênio e sob uma temperatura próxima de -120°C . Posteriormente, foram mergulhadas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196°C .

4.1.3 Avaliação do Sêmen Descongelado

Foram descongeladas três amostras de cada partida de cada reprodutor nos tratamentos, e experimentos a 37°C por 30 segundos e depositadas em tubos ependorff mantidas a 37°C . O sêmen descongelado foi submetido ao TTR durante 4 horas (Panganini Filho, 1999). As avaliações: motilidade espermática subjetiva, integridade de membrana plasmática (descritas na avaliação do sêmen fresco) e cinética espermática foram realizadas no momento da descongelação (HORA 0) e no TTR (HORA 4) de incubação a 37°C .

A avaliação da cinética espermática foi realizada pelo (CASA), utilizando o *hardware* IVOS (Sistema Visual de Integração Óptica) versão 12.3 empresa *Hamilton Thorne Bioscience* com o *software* *Animal Breeders*, configurado com o (*setup ovino*) recomendado pelo fabricante para sêmen ovino.

O sêmen foi diluído em um meio X-Cell[®], mantendo uma concentração final de aproximadamente 48×10^6 espermatozoides/mL (Davis et al., 1992) em seguida 6 μ L do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler[®] aquecida a 37°C e submetida à análise computadorizada da cinética espermática, a qual foram avaliados em três campos selecionados aleatoriamente, os seguintes parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto (μ m/s; VAP), velocidade retilínea (μ m/s; VSL), velocidade curvilínea (μ m/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (μ m; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF) e linearidade (%; LIN).

4.3 Análise Estatística

Para a análise dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco, descongelado e após o TTR, utilizou-se estatística descritiva dos dados, calculando-se média e desvio-padrão, seguida de análise de variância utilizando-se o procedimento GLIMMIX, sendo a comparação das medias feita pelo teste de Tukey corrigido para comparações múltiplas. Foi utilizado o programa SAS enterprise 5.1.

5 RESULTADOS

5.1.1 Experimento 1. Método de Adição do Plasma Seminal ao Sêmen Após a Coleta.

Comparando-se os tratamentos para os parâmetros de motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana na descongelação (HORA 0), os tratamentos T1 e T3 não diferiram entre si, mas foram superiores ($P < 0,05$) em relação aos tratamentos T2 e T4, os quais não diferiram entre si para os parâmetros relacionados acima. Os dados estão apresentados na (Tabela 3.1). Nos parâmetros de cinética espermática, fornecido pelo CASA, não houve diferença estatística entre os tratamentos após a descongelação (HORA 0) e no TTR (HORA 4).

Tabela 3.1. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 0). Para os quatro tratamentos, T1, T2, T3 e T4.

PARÂMETROS	HORA 0			
	T1	T2	T3	T4
MOTILIDADE SUBJETIVA (%)	41.90 \pm 3.2 ^a	28.56 \pm 4.1 ^b	46.44 \pm 2.7 ^a	29.60 \pm 3.1 ^b
MOTILIDADE TOTAL (%)	42.12 \pm 3.0 ^a	27.73 \pm 3.7 ^b	48.13 \pm 2.8 ^a	28.17 \pm 3.0 ^b
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	33.62 \pm 2.0 ^a	18.85 \pm 2.0 ^b	37.31 \pm 2.6 ^a	19.93 \pm 3.5 ^b
MEMBRANA INTEGRADA (%)	32.39 \pm 2.5 ^a	17.58 \pm 1.2 ^b	38.71 \pm 2.3 ^a	18.95 \pm 2.8 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

T1 - Adição de plasma seminal diretamente ao sêmen após a coleta, na quantidade de 30% em relação ao volume de sêmen.

T2 - Adição de plasma seminal no meio de criopreservação, na quantidade de 30% em relação ao volume de meio utilizado para a criopreservação.

T3 - Adição de plasma seminal no meio de pré-diluição, na quantidade de 30% em relação ao volume de meio de pré-diluição.

Volume de pré-diluição final é de 1:1 de (sêmen/meio)

T4 - Controle, sem adição de plasma seminal.

Os resultados do TTR (HORA 4) estão apresentados na (Tabela 3.2). Os tratamentos T1 e T3 foram superiores ($P < 0,05$) que os tratamentos T2 e T4 nos parâmetros de motilidade subjetiva e total. Para estes parâmetros não houve diferença entre os tratamentos T1 e T3 e entre T2 e T4.

Analisando a motilidade progressiva e a integridade de membrana, estas foram maiores ($P < 0,05$) no tratamento T3 comparados com outros tratamentos. Já o tratamento T1 foi maior ($P < 0,05$) que os tratamentos T2 e T4, os quais estes não diferiram entre si.

Tabela 3.2. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 4). Para os quatro tratamentos, T1, T2, T3 e T4.

PARÂMETROS	HORA 4			
	T1	T2	T3	T4
MOTILIDADE SUBJETIVA (%)	33.98 \pm 2.3 ^a	19.79 \pm 3.7 ^b	38.89 \pm 2.3 ^a	18.75 \pm 2.3 ^b
MOTILIDADE TOTAL (%)	32.44 \pm 2.0 ^a	18.92 \pm 3.9 ^b	39.62 \pm 1.3 ^a	18.40 \pm 2.2 ^b
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	24.89 \pm 1.8 ^b	10.08 \pm 3.9 ^c	33.27 \pm 1.5 ^a	9.47 \pm 1.2 ^c
MEMBRANA INTEGRÁ (%)	23.99 \pm 2.2 ^b	11.56 \pm 2.7 ^c	34.59 \pm 1.6 ^a	10.80 \pm 2.0 ^c

^{a,b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

T1 - Adição de plasma seminal diretamente ao sêmen após a coleta, na quantidade de 30% em relação ao volume de sêmen.

T2 - Adição de plasma seminal no meio de criopreservação, na quantidade de 30% em relação ao volume de meio utilizado para a criopreservação.

T3 - Adição de plasma seminal no meio de pré-diluição, na quantidade de 30% em relação ao volume de meio de pré-diluição.

Volume de pré-diluição final é de 1:1 de (sêmen/meio)

T4 - Controle, sem adição de plasma seminal.

5.1.2 Experimento 2. Efeito da Concentração de Plasma Seminal Adicionado ao Sêmen Logo Após a Coleta.

No experimento dois, após a descongelação (HORA 0) os tratamentos T30, T60 T90 foram maiores ($P < 0,05$) para os parâmetros de motilidade subjetiva, motilidade total,

motilidade progressiva, integridade de membrana, VCL em relação ao tratamento T0 (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$; VCL), após a descongelação (HORA 0). Para os quatro tratamentos; T30, T60, T90 e T0.

PARÂMETROS	HORA 0			
	T30	T60	T90	T0
MOTILIDADE SUBJETIVA (%)	52.36 \pm 4.4 ^a	52.29 \pm 3.8 ^a	47.22 \pm 3.4 ^a	35.69 \pm 3.6 ^b
MOTILIDADE TOTAL (%)	52.77 \pm 4.0 ^a	52.09 \pm 2.8 ^a	47.19 \pm 3.7 ^a	33.77 \pm 2.8 ^b
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	38.09 \pm 4.0 ^a	36.84 \pm 3.7 ^a	32.44 \pm 3.6 ^a	19.61 \pm 2.8 ^b
MEMBRANA INTEGRADA (%)	37.28 \pm 3.0 ^a	36.10 \pm 2.6 ^a	31.08 \pm 2.9 ^a	18.86 \pm 2.9 ^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	152.97 \pm 4.2 ^a	151.18 \pm 4.5 ^a	148.88 \pm 3.4 ^a	139.45 \pm 5.6 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

T30 - Adição de 30% de plasma seminal no meio de pré-diluição

T60 - Adição de 60% de plasma seminal no meio de pré-diluição

T90 - Adição de 90% de plasma seminal no meio de pré-diluição

T0 - Controle, sem adição de plasma seminal (T0).

Com relação ao TTR (HORA 4) apresentados na (Tabela 3.4). Os parâmetros de motilidade subjetiva e motilidade total nos tratamentos T30 e T60 foram maior ($P < 0,05$) em relação aos tratamentos T90 e T0 e o tratamento T90 foi maior ($P < 0,05$) comparado ao T0.

Para os parâmetros de motilidade progressiva, integridade de membrana, VCL e VSL foram maiores ($P < 0,05$) nos tratamentos T30, T60, T90 em relação ao tratamento T0.

Tabela 3.4. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$; VCL), após a descongelação (HORA 4). Para os quatro tratamentos; T30, T60, T90 e T0.

PARÂMETROS	HORA 4			
	T30	T60	T90	T0
MOTILIDADE SUBJETIVA (%)	42.63 \pm 3.3 ^a	37.91 \pm 2.5 ^a	35.86 \pm 3.4 ^b	24.86 \pm 2.1 ^c
MOTILIDADE TOTAL (%)	43.11 \pm 3.2 ^a	38.02 \pm 2.7 ^a	35.38 \pm 3.7 ^b	24.08 \pm 3.0 ^c
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	28.58 \pm 3.1 ^a	24.05 \pm 2.9 ^a	23.07 \pm 3.6 ^a	11.91 \pm 3.1 ^b
MEMBRANA INTEGRADA (%)	29.89 \pm 2.5 ^a	25.94 \pm 2.9 ^a	23.56 \pm 2.9 ^a	12.05 \pm 2.8 ^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	152.97 \pm 5.7 ^a	151.18 \pm 6.3 ^a	148.88 \pm 5.9 ^a	139.45 \pm 6.2 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

T30 - Adição de 30% de plasma seminal no meio de pré-diluição

T60 - Adição de 60% de plasma seminal no meio de pré-diluição

T90 - Adição de 90% de plasma seminal no meio de pré-diluição

5.1.3 Experimento 3. Efeito da Adição de Plasma Seminal de Reprodutores Inteiros e Vasectomizados ao Sêmen Após a Coleta.

Não houve diferença após a descongelação (HORA 0) e no TTR (HORA 4) nos parâmetros cinética espermática entre os tratamentos avaliados.

Após a descongelação (HORA 0) os tratamentos VAS e INT foram maiores ($P < 0,05$) nos parâmetros de motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana em relação ao tratamento CONT (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 0). Para os tratamentos; VAS, INT e CONT.

PARÂMETROS	HORA 0		
	VAS	INT	CONT
MOTILIDADE SUBJETIVA (%)	59.72 \pm 3.4 ^a	49.84 \pm 2.9 ^a	37.90 \pm 2.5 ^b
MOTILIDADE TOTAL (%)	60.08 \pm 2.6 ^a	49.74 \pm 3.6 ^a	36.58 \pm 3.5 ^b
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	40.94 \pm 3.4 ^a	31.79 \pm 3.4 ^a	22.12 \pm 1.9 ^b
MEMBRANA INTEGRADA (%)	39.52 \pm 2.7 ^a	30.95 \pm 2.6 ^a	21.18 \pm 2.7 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

T.VASEC - Adição de 30% de plasma seminal de reprodutor vasectomizado no meio de pré-diluição.

T.INT - Adição de 30% de plasma seminal de reprodutor inteiro no meio de pré-diluição.

T.CONT - Controle, sem adição de plasma seminal.

O tratamento VAS e INT foram maiores ($P < 0,05$) do que o tratamento CONT em relação a motilidade subjetiva no TTR (HORA 4). Já para os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana o tratamento VAS foi maior ($P < 0,05$) em relação ao tratamento INT e CONT. O tratamento INT apresentou significativamente maior ($P < 0,05$) comparado com tratamento CONT (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Média (\pm desvio padrão) da motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana, após a descongelação (HORA 4). Para os tratamentos; VAS, INT e CONT.

PARÂMETROS	HORA 4		
	VAS	INT	CONT
MOTILIDADE SUBJETIVA (%)	50.78 \pm 3.6 ^a	40.02 \pm 4.0 ^a	27.88 \pm 2.6 ^b
MOTILIDADE TOTAL (%)	51.92 \pm 3.5 ^a	38.86 \pm 2.9 ^b	28.91 \pm 2.2 ^c
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	35.46 \pm 3.4 ^a	24.36 \pm 3.5 ^b	12.19 \pm 3.0 ^c
MEMBRANA INTEGRÁ (%)	38.78 \pm 1.4 ^a	24.11 \pm 2.0 ^b	11.02 \pm 1.6 ^c

^{a,b,c} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

T.VASEC - Adição de 30% de plasma seminal de reprodutor vasectomizado no meio de pré-diluição.

T.INT - Adição de 30% de plasma seminal de reprodutor inteiro no meio de pré-diluição.

T.CONT - Controle, sem adição de plasma seminal.

6 DISCUSSÃO

Em busca de melhorias no sêmen criopreservado de ovinos, o plasma seminal vem sendo alvo de estudos. Maxwell et al. (1999), descreveram que o plasma seminal apresenta efeito benéfico sobre a função espermática e sobre a fertilidade do sêmen congelado ovino após IA cervical. O plasma seminal apresentou efeito positivo na motilidade e no aumento da resistência de espermatozoides ao choque pelo frio (*cold-shock*), sendo esta propriedade atribuída às proteínas do plasma seminal (Barrios et al. 2000; Pérez-Pé et al., 2001).

Com relação à adição do plasma seminal de carneiros com sêmen de alta congelabilidade no sêmen de carneiros de baixa congelabilidade, foi evidente uma melhoria na qualidade do sêmen nos experimentos realizados. Esse desempenho positivo na qualidade do sêmen pode ser atribuído ao efeito protetor a membrana plasmática, motilidade, estresse oxidativo promovido pelo plasma seminal. Varias pesquisas sugerem que o plasma seminal pode influenciar positivamente na qualidade do sêmen e na fertilidade de machos (Barrios et al., 2000; Barrios et al., 2005; Dominguez et al., 2008).

No capítulo 2 observamos que proteínas do plasma seminal do carneiro de alta congelabilidade de sêmen podem estar diretamente relacionada com a qualidade de sêmen criopreservado. Essas proteínas com maior expressão nesse carneiro contribuem para efeito protetor tanto de membrana espermática, motilidade espermática e contra estresse oxidativo. Quando realizou a adição de plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade de sêmen, observou significativa melhora na qualidade de sêmen. Esse efeito protetor pode estar sendo influenciado pelas proteínas do plasma seminal do carneiro com sêmen de alta congelabilidade

encontradas com maior expressão nesse carneiro. Proteínas do plasma seminal ligam-se a membrana plasmática de espermatozoides danificados, restaurando-a (Barrios et al., 2000). Este efeito protetor foi atribuído às proteínas de 14 kDa e 20 kDa (Barrios et al., 2005), secretadas especificamente pelas glândulas vesiculares ovinas, denominadas de RSVP14 e RSVP20, respectivamente (Fernandez-Juan et al., 2006).

Observou-se que a adição do plasma seminal após a coleta do sêmen pode prevenir os danos causados pelo processo de criopreservação, melhorando assim a motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana após a descongelação e o TTR em todos os experimentos. Cardozo et al., (2009) observaram uma perda de proteínas de membrana após o descongelamento, indicando que essas proteínas devem ter sido perdidas como resultado de danos induzidos pelo processo de congelamento/descongelamento. Dominguez et al., 2008 relataram que após a incubação de plasma seminal ao sêmen descongelado possibilitou a recuperação de proteínas seminais ligadas a superfície do espermatozoides perdidas no processo de criopreservação de sêmen.

No experimento 1, notou-se que a forma de adição do plasma seminal do tratamento T3, foi superior em relação aos outros tratamentos em especial ao tratamento controle. Esse resultado pode estar relacionado à presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema do ovo presente no meio de diluição utilizado na criopreservação. Devido a seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozoides (Salamon & Maxwell, 1995), a gema de ovo nos diluidores está associada a outros ingredientes previne o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal (Amirat et al., 2004).

No tratamento T3 o plasma seminal é diluído com o meio de pré-diluição, essa interação pode estar sendo mais benéfica trazendo um maior efeito protetor aos espermatozoides, em relação às outras formas de adição do plasma seminal. Bergeron & Manjunath. (2006) relatam que as frações das LDL tem adesão a membrana plasmática, exercendo proteção durante a criopreservação. Nesse tratamento T3 o intuito foi de retirar uma pequena quantidade de volume de meio de pré-diluição 30% evitando afetar a composição do meio final e fornecer após a coleta uma maior proteção dos espermatozoides com o plasma seminal e o meio de pré-diluição importante na manutenção da qualidade do sêmen para toda a etapa de criopreservação. O tratamento T2 teve adição de plasma seminal direto no meio de diluição total. Nesse tratamento são retirados 30% de volume de meio e adicionado o plasma

seminal, isso pode estar interferindo na composição dos reagentes presentes no meio de diluição e causando alteração em suas proporções e trazendo danos aos espermatozoides.

Com relação ao experimento 2, independentemente da concentração, a adição de plasma seminal ao sêmen, se mostrou eficiente com relação a manutenção da qualidade do sêmen criopreservado. Existem poucos relatos a respeito da concentração que deve ser utilizada, para beneficiar o sêmen criopreservado principalmente após a coleta de sêmen. Nos trabalhos de Barrios et al. (2000) e El-Hajj-Ghaoui et al. (2007), observaram que quanto maior o volume de proteínas do plasma seminal adicionado ao sêmen melhor a proteção ao espermatozoide criopreservado.

Lausmann et al. (2004), verificando a ação do plasma seminal adicionado na descongelamento, em várias concentrações, sobre o estado de capacitação espermática, observaram que concentrações acima de 75% de plasma seminal permitem a efetiva proteção dos espermatozoides. Maxwell et al (1999), utilizando a ressuspensão de 20 a 30% de plasma seminal diluído em PBS em sêmen descongelado de carneiro após a centrifugação, obtiveram um incremento dos índices de prenhez mediante sua aplicação por via cervical superficial.

No experimento 3 observou-se uma significativa melhora dos parâmetros para adição de plasma seminal de reprodutores vasectomizados. Sugere-se que com a vasectomia se tem uma maior concentração de proteínas no plasma seminal, pelo fato de não ter a presença de espermatozoides, no qual as proteínas poderiam aderir a estes. El-Hajj-Ghaoui et al., 2007 observaram que a concentração de proteínas presente no plasma seminal de reprodutores vasectomizados é significativamente maior, chegando a ser o dobro a concentração de proteínas do que no plasma seminal de reprodutor inteiro. Esse aumento da concentração de proteínas pode contribuir para uma melhor proteção da membrana espermática e melhor motilidade como encontrado no presente trabalho.

Com a vasectomia sugere que não se tenha a produção de EROs por se ter um meio livre de espermatozoide, com relação ao plasma seminal de carneiro inteiro. A manipulação do sêmen após a coleta e centrifugação pode favorecer a produção de EROs e com isso ficar resíduos de EROs no plasma seminal após a centrifugação. Segundo, Agarwal et al. (2006), a manipulação de sêmen é capaz de ativar a produção de ROS, sendo esse fator agravado pela redução das concentrações de antioxidantes no plasma seminal como consequência do processo de diluição.

7. CONCLUSÃO

Com base nesses resultados, pode-se concluir que a adição do plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade exerce efeito protetor sobre os espermatozoides de carneiros de baixa congelabilidade após a coleta de sêmen. Novos estudos devem ser realizados utilizando a inseminação artificial com o sêmen adicionado de plasma seminal para validar sua utilização.

7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e o CNPq pela bolsa estudantil, ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v.63, p.1531-1537, 2000.

BARRIOS B. et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, 588–595, 2005.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular and Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006.

CARDOZO, J.A.; GRASA, P.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN, J. A. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. **Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v 10 p. 51-59, 2009.

DOMINGUEZ, M.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R.; Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology** 69, 564–573, 2008

El-Hajj, Ghaoui. R.; Gillan, L.; Thomson, P.C.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. **J Androl** 28, 109–122, 2007.

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

FERNÁNDEZ-JUAN, M. et al. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p.721–732, 2006.

FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A.; PŁUCIENNICZAK, G.; KOTŁOWSKA, M.; KORDAN, W.; WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.; STRZEŻEK, J. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reproductive Biology**, v.6, p.5-20, 2006.

HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., SHARPE, P., BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.

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

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, London, v. 53, p. 47-58, 2000.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v.65, p.33-46, 2005.

LAUSMANN, C. V., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D., *et al.* Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**,v.28, n.3. p.150-157, 2004.

LEAHY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.: Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. **Anim Reprod Sci.** 119, 47–153. 2010.

MAXWELL, W. M. C., EVANS, G., MORTIMER, S. T. *et al.* Normal fertility in ewes after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, Sydney, v.11, p.123-126, 1999.

MAXWELL, W. D.E.; GRAAF, S.; GHAOUI, R.; EVANS. G.; Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Soc Reprod Fertil Supp** 64, 13–38, 2007.

MOURA, P.P.; FRANCO, M.M.; SILVA, T.A.S.N.; ROCHA, T.L.; LEAL, D.R.; PASSOS, P.I.B.; NEVES, J.P. Characterization of seminal plasma proteins and its relationship with quality parameters of frozen semen in ram. **Ciênc. Rural** 40, 1154-1159, 2010.

OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reprod. Fertil. Dev.** Zaragoza, v.9, p. 381-390, 1997.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v.56, p.425-434, 2001.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.

SILVA, T. A. S. N., NEVES, J.P., BRAGANÇA, J. M., GONÇALVES, P.B.D., RUMPF, R. Uso do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino para inseminação transcervical em ovelhas com estro sincronizado. **Anais da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – XIX SBTE** Angra dos Reis, 2005.

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

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial permite o incremento na eficiência reprodutiva e consequentemente aumento da produtividade dos rebanhos, através da utilização de reprodutores geneticamente superiores. Quando se utiliza sêmen criopreservado este apresenta resultados, por vezes inconsistentes, invariavelmente causado pela baixa qualidade do sêmen criopreservado.

Na busca de ferramentas para a melhoria da eficácia da criopreservação de sêmen ovino, o plasma seminal sendo considerado como uma alternativa eficiente. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a importância do plasma seminal na criopreservação do sêmen ovino. Vale destacar que as proteínas do plasma seminal, RSVP14, RSVP20, clusterina, albumina e glutathione peroxidase, apresentam-se em maior expressão em carneiro de alta congelabilidade. Proteínas essas que estão envolvidas na resistência a criopreservação de sêmen. Na outra ponta se destacou a proteína espermadezina Z13 proveniente de plasma seminal de carneiro de baixa congelabilidade, essa proteína é forte candidata a baixa congelabilidade.

A adição do plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade pode exercer efeito protetor sobre os espermatozoides de carneiros de baixa congelabilidade após a coleta de sêmen, contribuindo assim para o avanço do conhecimento do processo de criopreservação de sêmen ovino.