

LEONARDO TONDELLO MARTINS

**ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO COMO
ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A FERTILIDADE DO SÊMEN
OVINO CONGELADO**

LAGES – SC

2009

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LEONARDO TONDELLO MARTINS

ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO COMO
ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A FERTILIDADE DO SÊMEN
OVINO CONGELADO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Professor Alceu Mezzalira

LAGES – SC


2009

LEONARDO TONDELLO MARTINS

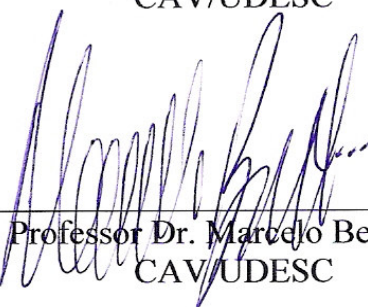
**ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO COMO
ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A FERTILIDADE DO SÊMEN
OVINO CONGELADO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

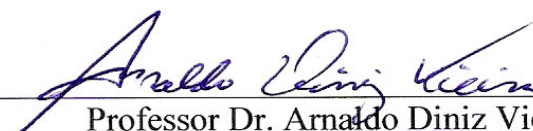
Banca Examinadora:



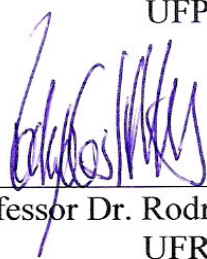
Professor Dr. Alceu Mezzalira
CAV/UDESC



Professor Dr. Marcelo Bertolini
CAV/UDESC



Professor Dr. Arnaldo Diniz Vieira
UFPEL



Professor Dr. Rodrigo Costa Mattos
UFRGS

Lages, SC, 19 Janeiro de 2009.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC)

Martins, Leonardo Tondello

Adição de plasma seminal heterólogo como estratégia
para aumentar a fertilidade do sêmen ovino congelado /
Leonardo Tondello Martins – Lages, 2009.
48 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UEDESC.

1. Fragmentação de DNA. 2. Inseminação. 3. Neutral Comet Assay. 4. SDS-PAGE. I. Título.

CDD – 636.08926

AGRADECIMENTOS

Aos professores e amigos Alceu Mezzalira, Arnaldo Diniz Vieira, Marcelo Bertolini, Fabiana Forell e Lúcio Rauber pelo apoio incondicional em todos os momentos, compreensão e ensinamentos recebidos.

Aos integrantes do Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem, em especial aos irmãos de luta Eduardo de Souza Ribeiro, Pedro Claudino dos Santos Neto, Saul Gaudêncio Neto, Joana Cláudia Mezzalira, Fabiano Koerich Vieira, Lain Uriel Ohlweiler, Murilo Farias, Matheus Cesaro Pedrotti, Jamir Machado, Luiz Miguel Rech dos Santos e Monalyza Cadore Gonçalves.

E de forma muito especial, a toda minha família que jamais mediu esforços para que meus sonhos se concretizassem.

Dedico este trabalho a meus pais amados e ao meu querido irmão. Também para todos aqueles que estimulam o crescimento intelectual bem como inspiram o desenvolvimento científico.

RESUMO

O uso de sêmen congelado é um pré-requisito para maximizar o ganho genético oriundo da IA em ovinos. Muito embora a IA com sêmen fresco ou resfriado esteja consolidada, com sêmen congelado os resultados são inconsistentes. O uso de plasma seminal (PS) já foi demonstrado como eficaz na proteção e reversão de parte dos danos celulares causados pela criopreservação. Entretanto, o pequeno volume do ejaculado e o risco de transmissão de doenças espécie-específicas são limitações importantes nos ovinos. Uma alternativa a ser considerada é o uso de PS heterólogo, que pela escassez de informações disponíveis, justificam a execução deste estudo, cujos objetivos foram: (a) determinar a capacidade do PS equino (PSE) e bovino (PSB) em preservar a viabilidade do sêmen ovino descongelado, comparando-os com o PS ovino (PSO); (b) avaliar o perfil eletroforético das proteínas presentes no PSO, PSE e PSB, e adicionalmente; c) quantificar e comparar o nível de fragmentação do DNA de espermatozóides incubados ou não com PSO, PSE ou PSB. Para tanto, três experimentos foram conduzidos, sendo: Experimento 1: Sêmen descongelado diluído em meio sem PS (SPS) ou contendo 25% de PSO, PSE ou PSB, com exposição por um período de 5 min ou 6 h. Avaliou-se a motilidade, integridade de membrana plasmática e proporção de espermatozóides vivos. No Experimento 2 avaliou-se a concentração protéica total encontrada no PSO, PSE e PSB, bem como o perfil eletroforético das proteínas presentes, mediante SDS-PAGE. No Experimento 3 foi validada uma técnica para a avaliação da integridade do DNA espermático (*Neutral Comet Assay* - NCA), procedendo-se a avaliação de todos os tratamentos testados nos experimentos anteriores, além dos tratamentos: sêmen descongelado (SD), sêmen fresco (SF) e um controle positivo (CP). Adicionalmente foi avaliado o efeito da técnica de seleção espermática *swim up* sobre os achados de fragmentação de DNA pelo NCA. A análise estatística foi realizada com o pacote do SAS ou do Minitab, com nível de significância de 5%. Como resultados, observou-se que a exposição por 5 min. em PSO, PSE ou PSB teve efeito benéfico sobre os parâmetros de viabilidade avaliados. A incubação por 6 h reduziu ($P < 0,05$) a motilidade espermática nos tratamentos PSE e PSO, em relação ao SPS e PSB. A integridade de membrana plasmática não foi afetada pelo tratamento. A concentração protéica total no PSO, PSE e PSB foi 16,8, 3,0 e 25,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. O PSO e PSB demonstraram padrões eletroforéticos semelhantes, enquanto o PSE apresentou um perfil distinto. A menor

fragmentação de DNA com 1 h de incubação foi obtida com o grupo SF, não havendo diferença entre os demais grupos. Com 6 h de incubação, os grupos SPS (63%) e SD (70%) demonstraram maior fragmentação que o tratamento SF (50%), não havendo diferenças entre os tratamentos PSO (60%), PSE (52%) e PSB (55%). Não foi observado efeito da técnica de seleção *swim up* na fragmentação do DNA, avaliada pelo NCA. Conclui-se que o PS heterólogo pode ser utilizado em substituição ao PSO, mesmo apresentando perfil protéico distinto. Entretanto, a viabilidade espermática foi influenciada pelo tempo de incubação. Em adição, as modificações adotadas no método *Neutral Comet Assay* possibilitaram sua validação para o sêmen ovino. Por final, o sêmen ovino apresenta uma elevada taxa de fragmentação de DNA, que não difere entre os espermatozoides selecionados ou não pelo método *swim up*.

Palavras Chave: Fragmentação de DNA, inseminação, *Neutral Comet Assay*, *SDS-PAGE*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sistema de envase do sêmen, PS e diluente em palhetas de 0,25 mL.....	18
Figura 2. Motilidade (a), integridade funcional de membrana plasmática (b) e percentual de espermatozóides ovinos do grupo parcial (GP) incubados por 5 min em solução contendo 25% de plasma seminal ovino (PSO), equino (PSE) ou bovino (PSB) e, em seguida incubados à 37°C por 6 h.....	24
Figura 3. Motilidade (a), integridade funcional de membrana plasmática (b) e percentual de espermatozóides vivos (c) do grupo integral (GI), incubados em 25% de plasma seminal ovino (PSO), equino (PSE) ou bovino (PSB), durante 6 h à 37°C.....	26
Figura 4. Perfil protéico do PSO, PSE e PSB, realizado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 17% com amostras padronizadas para obtenção de 25 µg de proteína/poço. Linha 1 - marcador de peso molecular (Biorad Broad Range); Linha 2 – PSO; Linha 3 – PSE; Linha 4: PSB.....	27

Figura 5. Fragmentação do DNA de espermatozóides ovinos descongelados, adicionados de plasma seminal ovino (PSO), eqüino (PSE), bovino (PSB), por 5 min, ou sem plasma seminal (SPS) e selecionados por *swim up*. SD = sêmen descongelado; SF = sêmen fresco; CP = controle positivo incubado em 400 μ M de H₂O₂.....

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CP	Controle positivo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GI	Grupo integral
GP	Grupo parcial
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Inseminação artificial
NaCl	Cloreto de sódio
NCA	<i>Neutral Comet Assay</i>
N ₂	Nitrogênio líquido
N ₂ EDTA	EDTA di-sódico
N ₄ EDTA	EDTA tetra-sódico
TBE	Solução tampão (TRIS-Borato-EDTA)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PS	Plasma seminal
PSB	Plasma seminal bovino
PSE	Plasma seminal equino

PSO	Plasma seminal ovino
SD	Sêmen descongelado
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SF	Sêmen fresco
SPS	Sem plasma seminal

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Danos criogênicos no espermatozóide ovino.....	4
2.2 Congelamento como causa da baixa fertilidade do sêmen ovino.....	6
2.3 Estratégias para melhorar a fertilidade do sêmen ovino congelado.....	7
2.4 Plasma seminal e proteínas protetoras.....	10
2.5 Plasma seminal heterólogo na criopreservação do sêmen ovino.....	11
3 CAPÍTULO ÚNICO: Adição de plasma seminal heterólogo como estratégia para aumentar a fertilidade do sêmen ovino congelado.....	13
3.1 Introdução	14
3.2 Materiais e métodos.....	15
3.3 Resultados.....	23
3.4 Discussão.....	29
3.5 Conclusões.....	35
3.6 Referências bibliográficas.....	36
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros trabalhos relacionados ao emprego da inseminação artificial (IA) para a espécie ovina foram elaborados no início do século XX. Desde então, diversos experimentos foram conduzidos buscando o seu aperfeiçoamento, o que resultou na sua consolidação como biotecnologia de interesse comercial. Como consequência, houve uma intensificação do melhoramento genético, bem como um incremento substancial na produção de carne, leite e lã, impulsionando a indústria ovina (Evans & Maxwell, 1987).

Amplios programas de IA passaram a ser adotados e, conseqüentemente, houve a necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitissem a preservação de sêmen sob condições artificiais, visando prolongar a sua sobrevivência (Salamon & Maxwell, 1995). Essas metodologias consistiram basicamente no armazenamento do sêmen sob refrigeração ou congelamento (Salamon e Maxwell, 2000). Contudo, o processamento seminal (diluição, incubação, resfriamento, congelamento e reaquecimento) produz uma inevitável redução da viabilidade espermática em virtude de alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais (Watson, 2000). Estas alterações são mais severas em espermatozoides criopreservados, resultando que o emprego do sêmen congelado historicamente esteve condicionado ao método de inseminação intra-uterina, através da laparoscopia (Salamon & Maxwell, 1995). Entretanto, restrições vinculadas ao alto custo do equipamento e aos custos adicionais com protocolos de sincronização do estro e ovulação, além da necessidade de profissionais altamente especializados, dificultaram a ampla difusão da IA intra-uterina para as ovelhas (Kershaw *et al.*, 2005). Ainda, embora considerada uma técnica pouco invasiva e de alta repetibilidade, a IA intra-uterina gera questões relacionadas à proteção do bem estar

animal (Anel *et al.*, 2006). A partir desse contexto, são relevantes os esforços conduzidos para o aperfeiçoamento de métodos mais simples e menos invasivos, que poderiam ser atrativos para a indústria ovina.

Um número considerável de trabalhos consolidou a eficácia da IA cervical quando realizada a partir de sêmen fresco ou resfriado (Maxwell & Salamon, 1993; Donovan *et al.*, 2004; Anel *et al.*, 2006). Entretanto, quando realizada com sêmen congelado a IA cervical proporciona resultados extremamente inconsistentes (O'Meara *et al.*, 2005; O'Meara *et al.*, 2007; El-Hajj Ghaoui *et al.*, 2007) condicionados, sobretudo, à taxa de penetração cervical no momento da IA (Gillan & Maxwell, 1999; Álvarez *et al.*, 2000; Salamon & Maxwell, 2000). Infelizmente, a estrutura anatômica da cérvix ovina constitui-se numa relevante barreira à penetração, que varia em virtude de fatores como o comprimento e a excentricidade dos anéis cervicais (Álvarez *et al.*, 2000), que por sua vez são determinados por peculiaridades raciais e individuais de conformação da cérvix (Eppleston *et al.*, 1994; Kaabi *et al.*, 2006).

Mesmo com os efeitos negativos ocasionados pelo processo de criopreservação, o uso de sêmen congelado representa um pré-requisito para a maximização do ganho genético oriundo da IA. Entretanto, para o seu emprego é imprescindível a adequação dos protocolos previamente utilizados, para minimizar os danos celulares e manter a viabilidade espermática, favorecendo a transposição cervical. Dentre as estratégias já testadas por outros grupos, o uso de plasma seminal (PS) homólogo mostrou-se eficaz para a proteção e reversão de parte significativa dos danos celulares causados durante a criopreservação espermática. Entretanto, limitações referentes ao pequeno volume do ejaculado dos ovinos e o risco de transmissão de doenças espécie específicas tem dificultado a disseminação do uso do PS homólogo. Como alternativa deve-se

considerar a possibilidade do uso de PS heterólogo, de espécies de maior porte e que viabilizem a formação de bancos de PS, bem como permitam contornar os riscos sanitários decorrentes do uso de PS homólogo. A escassez de informações relativas ao uso do PS de equinos e bovinos como aditivo ao sêmen ovino descongelado, justifica a execução deste trabalho, que tem por objetivos: (a) determinar a capacidade do PS equino (PSE) e bovino (PSB) em preservar a viabilidade do sêmen ovino descongelado, mediante avaliações *in vitro*, comparando-as com o PS ovino (PSO); (b) avaliar o perfil eletroforético das proteínas presentes no PSO, PSE e PSB, através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); e c) quantificar e comparar a fragmentação do DNA em espermatozóides incubados ou não com PSO, PSE ou PSB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Danos criogênicos no espermatozóide ovino

A baixa viabilidade espermática observada no pós-descongelamento está condicionada a alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais determinadas pelo processamento seminal, incluindo a diluição, o resfriamento, o armazenamento, o congelamento e o reaquecimento espermático.

Danos criogênicos são observados primariamente nas membranas celular e acrossomal, bem como no acrossoma espermático (Salamon & Maxwell, 1995). A membrana celular é particularmente susceptível às oscilações térmicas envolvidas durante o processamento seminal, sendo observada a fluidificação da superfície espermática devido ao rearranjo e perda de moléculas lipídicas e protéicas após a criopreservação (Thibault, 1993; Thérien *et al.*, 1998; Pérez-Pé *et al.*, 2001). Essa desorganização estrutural acarreta em rupturas na membrana, bem como no aumento da permeabilidade iônica (Robertson *et al.*, 1988), que atuam perturbando a homeostasia espermática.

É importante ressaltar que desorganização estrutural associada à criopreservação predispõe os espermatozóides à reações semelhantes aos processos de capacitação e reação acrossomal (Watson, 2000). O congelamento causa uma alteração do citoesqueleto espermático, pela despolimerização da actina (Hall *et al.*, 1993). Nesse sentido, essa modulação citoesquelética contribui para a fusão das membranas celular e acrossomal externa, favorecendo a excitose do conteúdo acrossomal (Spungin *et al.*, 1995). Entretanto, essas alterações manifestam-se sob forma desorganizada (Watson &

Green, 2000), precocemente após o descongelamento (Lausmann *et al.*, 1994), reduzindo a longevidade do espermatozóide.

A desestabilização das membranas espermáticas causada pela criopreservação ainda conduz a alterações bioquímicas severas, que atuam reduzindo a funcionalidade dos espermatozóides. A atividade enzimática de espermatozóides congelados parece sofrer alterações significativas, como a redução funcional das enzimas fosfatases (Vorobjev *et al.*, 1980) e da fosfolipase A2 (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 1980), que são cruciais em eventos referentes à modulação dos processos de capacitação e reação acrossomal. Sobretudo, foi determinada a inativação parcial das enzimas hialuronidase e acrosina acrossomal (Tsekova *et al.*, 1988). Hipoteticamente, a baixa funcionalidade dessas enzimas tende reduzir a atividade proteolítica das enzimas acrossomais, afetando a capacidade fecundante do espermatozóide.

Os mecanismos antioxidantes naturais também são afetados pelo processamento seminal (Chatterjee & Gagnon, 2001), tornando os espermatozóides mais vulneráveis ao estresse oxidativo (Linfor & Meyers, 2002; López-Fernandéz *et al.*, 2008). Nesse sentido, o acúmulo de radicais livres determina a desestabilização das membranas espermáticas, a fragmentação do DNA espermático (Peris *et al.*, 2004; Fraser & Strzezek, 2005) e, conseqüentemente, a redução da motilidade e capacidade fecundante (Aitken *et al.* 1998).

Adicionalmente, o congelamento seminal acarreta alterações como o aumento da concentração intracelular de Ca^{++} e a concomitante redução de K^{+} (Profirov *et al.*, 1980); redução da síntese de ADP e ATP (Platov *et al.*, 1973); decréscimo da atividade respiratória mitocondrial (Maxwell *et al.*, 1999) e redução na concentração seminal de prostaglandinas (Marley *et al.*, 1976).

Com base nas informações abordadas, é possível inferir que as alterações ultra-estruturais causadas pela criopreservação são determinadas por oscilações bioquímicas e seu sinergismo promove a redução da integridade funcional espermática.

2.2 Congelamento como causa da baixa fertilidade do sêmen ovino

Conforme já parcialmente descrito, a criopreservação atua em diferentes níveis, reduzindo a viabilidade espermática e interferindo, desta forma, sobre a capacidade fecundante do sêmen ovino, principalmente quando empregado na IA cervical. Estudos *in vivo* demonstraram que no sêmen ovino criopreservado, o tempo de manutenção da viabilidade espermática é três vezes menor que o sêmen fresco (Lopyrin *et al.*, 1971). Adicionalmente, foi detectado que o transporte espermático através da cérvix ovina se torna precário após a criopreservação (Armstrong & Evans, 1984). Assim, a população espermática presente na zona de fecundação também é inadequada após a IA cervical com sêmen congelado (Salamon & Lightfoot, 1967). Esse efeito é agravado pela ação de polimorfonucleares uterinos que atuam favorecendo a inativação, bem como a eliminação espermática via vaginal (Gillan & Maxwell, 1999). A probabilidade, numa escala de 0 a 1, de espermatozóides alcançarem a zona de fecundação, segundo método preconizado por Platov (1983) é de 0,8 – 1 para o sêmen fresco, de 0,5 – 0,8 para o sêmen resfriado e de 0,4 para o sêmen ovino criopreservado. Tal redução torna a IA cervical com sêmen congelado pelo uso de metodologias convencionais uma técnica inconsistente e não confiável.

Além da menor fertilidade, ovelhas inseminadas por via cervical, com sêmen congelado, também apresentam uma maior taxa de mortalidade embrionária precoce

(Langford *et al.*, 1979). Provavelmente, estas perdas se devem ao “envelhecimento espermático” ao longo do trato genital feminino, o que determina uma incompatibilidade entre o estágio de maturação espermática e oocitária (Maxwell *et al.*, 1986).

Por fim, a menor integridade biológica de espermatozóides criopreservados justifica a baixa fertilidade obtida a partir da IA cervical. Por conseqüência, torna-se relevante buscar o desenvolvimento de novas metodologias de criopreservação, assim como o uso de aditivos que permitam minimizar os danos celulares causados pela criopreservação, incrementando a fertilidade e viabilizando a IA cervical com sêmen congelado em ovinos.

2.3 Estratégias para melhorar a fertilidade do sêmen ovino congelado

Os resultados insatisfatórios proporcionados pelo uso de sêmen ovino congelado na IA cervical determinaram uma busca por estratégias que prolonguem a viabilidade seminal, otimizem o transporte espermático e, como conseqüência, elevem as taxas de prenhez.

O aumento da concentração de espermatozóides na dose inseminante ($\geq 300 \times 10^6$ espermatozóides móveis) representa uma alternativa consistente para o incremento da fertilidade obtida a partir da IA cervical com sêmen congelado, permitindo a obtenção de taxas de prenhez superiores a 30%. Essa melhora é motivada pelo aumento da população espermática viável ao longo do trato genital feminino. Como conseqüência, mais espermatozóides são transportados, o que favorece a fecundação e, por sua vez, melhora a taxa de nascimentos após a IA cervical com sêmen congelado (Salamon & Lightfoot, 1970). Entretanto, existe uma limitação do volume empregado na dose inseminante,

sendo recomendados volumes entre 50 e 200 μL (Evans & Maxwell, 1987). Volumes acima de 200 μL não são retidos na abertura cervical externa, escorrendo para cavidade vaginal. Além disso, o emprego de uma dose inseminante elevada interfere na logística dos programas de IA representando uma situação incompatível com a eficiência da disseminação de material genético nos rebanhos, o que impediu que a estratégia fosse consolidada.

Outra alternativa que representa uma possibilidade de avanço para a obtenção de uma melhor fertilidade é a dupla IA (Salamon & Maxwell, 2000). Entretanto, a magnitude dessa resposta geralmente está condicionada à concentração espermática utilizada em cada inseminação, sendo necessária uma dose inseminante total de pelo menos 200×10^6 espermatozoides (El-Hajj Ghaoui *et al.*, 2007). Em adição, a necessidade de mão-de-obra e manejo adicionais, reduz sua viabilidade para médios e grandes rebanhos.

A correlação positiva existente entre nível de penetração cervical e taxa de prenhez (Salamon & Maxwell, 2000) evidenciam que este fator também merece atenção. Métodos alternativos buscando otimizar a penetração cervical foram desenvolvidos (Meghan *et al.*, 2004). Contudo o grau de penetrabilidade manteve-se condicionado à fatores como o comprimento e a excentricidade dos anéis cervicais (Álvarez *et al.*, 2000), o que na prática é de difícil avaliação.

Adicionalmente, foi testada a administração de fármacos como a relaxina, oxitocina, estrógenos e prostaglandinas, com objetivos de favorecer o relaxamento cervical, e intensificar a atividade contrátil do trato genital feminino. No entanto, o custo e a inconsistência dos resultados obtidos não permitiram a incorporação dessas estratégias como rotina em programas de IA (Salamon & Lightfoot, 1970).

Recentemente, o desenvolvimento de metodologias direcionadas à minimização do estresse oxidativo durante o processamento seminal, proporcionou resultados promissores com a inclusão de antioxidantes aos diluentes de manutenção (Bucak & Tekin, 2007) e congelamento espermático (Bucak *et al.*, 2008). Entretanto, características espécie-específicas e os distintos mecanismos de ação dos antioxidantes limitam sua utilização mais disseminada (Askari *et al.*, 1994; O'Flaherty *et al.*, 1997). Adicionalmente, as injúrias oxidativas representam apenas um dos inúmeros fatores envolvidos nos possíveis danos ocasionados pela criopreservação. Neste contexto, observa-se que o efeito benéfico das metodologias propostas isoladamente é demasiadamente restrito. A criopreservação estabelece um extenso rol de danos e requer, desta forma, métodos mais abrangentes para a crioproteção espermática.

Estudos demonstraram que a suplementação com plasma seminal (PS) ou com seus componentes protéicos foi eficaz na prevenção e reversão de grande parte dos danos provocados pelo congelamento seminal (García López *et al.*, 1996; Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001). Adicionalmente, a inclusão de PS homólogo demonstrou ser eficaz para a sustentação do estado espermático decapacitado (Abney *et al.*, 1970, Lausmann *et al.*, 1994, Manjunath *et al.*, 1994), bem como para a manutenção da motilidade e viabilidade espermática para touros (Baas *et al.*, 1983), garanhões (Aurich *et al.*, 1996) e carneiros (Garner *et al.*, 2001). O PS atua em diferentes mecanismos, preservando a sobrevivência espermática e, embora com resultados ainda modestos, seu uso como um aditivo ao sêmen ovino representa uma alternativa promissora para o aumento da criotolerância espermática.

2.4 Plasma seminal e proteínas protetoras

O PS consiste em um fluido de composição complexa, sintetizado a partir da rete testis, epidídimos e glândulas anexas (Troedsson *et al.*, 2005). No sêmen, o PS desenvolve funções fisiológicas básicas como tamponamento, transporte e suporte energético desde a ejaculação até a passagem ao longo do trato genital feminino (Maxwell & Jonhson, 1999). A composição química do PS não foi totalmente esclarecida, entretanto muitos trabalhos foram desenvolvidos visando complementar seu mapeamento e, nesse sentido, alguns componentes demonstraram exercer funções específicas sobre a integridade funcional espermática. A capacidade protetora do PS foi atribuída especialmente à presença de proteínas com peso molecular de 14 e 20 kDa (Barrios *et al.*, 2005) produzidas pelas glândulas anexas de machos inteiros e/ou vasectomizados (El-Hajj Ghaoui *et al.*, 2007). Em adição, proteínas pertencentes às classes *Fn-2 type proteins*, *Spermadhesin proteins* e *CRISP proteins* foram recentemente responsabilizadas pela modulação da capacitação espermática, reconhecimento e fusão espermático-oocitária (Manjunath *et al.*, 1994; Thérien *et al.*, 1998; Topfer-Petersen *et al.*, 2005; Barrios *et al.*, 2005; Jobim *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2006). Também foram identificadas proteínas e fatores antioxidantes capazes de conservar a integridade funcional da membrana celular e reverter injúrias oriundas de fenômenos como a peroxidação lipídica (Maxwell & Watson, 1996; Balercia *et al.*, 2003) e choque térmico (Berguer *et al.*, 1985; Barrios *et al.*, 2000). Nesse sentido, a estabilização da superfície espermática oferece proteção adicional contra a ação de polimorfonucleares uterinos que atuam eliminando espermatozóides danificados por via vaginal (Strzezek *et al.*, 1992). Finalmente, em virtude da alta concentração de prostaglandinas presente no PS (Gustafsson *et al.*, 1977), sua suplementação tende a otimizar o transporte espermático

através da cérvix, útero e oviduto. A proteção espermática determinada por diferentes constituintes do PS provavelmente permitiu obter melhores índices para o transporte espermático *in vitro* e taxas semelhantes de prenhez entre a IA cervical e intra-uterina por laparoscopia, empregando sêmen ovino criopreservado e adicionado de PS homólogo após o descongelamento (Maxwell *et al.*, 1999).

2.5 Plasma seminal heterólogo na criopreservação do sêmen ovino

Apesar dos efeitos positivos do PS terem gerado uma possibilidade de avanço com a utilização do sêmen ovino congelado na IA cervical, limitações relacionadas ao pequeno volume do ejaculado dos ovinos e os riscos sanitários oriundos da utilização do PS homólogo constituem barreiras a serem superadas. Como alternativa, deve-se considerar que o PS de outras espécies pode determinar um efeito protetor equivalente ao observado com a adição de PS ovino. Essa hipótese é fundamentada na identificação de um alto grau de homologia entre proteínas do PS bovino e ovino (Thérien *et al.*, 1995; Jobim *et al.*, 2005; Bergeron *et al.*, 2005) e entre o PS bovino e eqüino (Calvete *et al.*, 1997, Brandon *et al.*, 1999). Adicionalmente, além dos efeitos benéficos proporcionados pela adição de plasma seminal homólogo ao sêmen eqüino (Kareskoski *et al.*, 2006) e bovino (Garner *et al.*, 2001), é importante ressaltar que o emprego de PS bovino demonstrou ser capaz de proteger espermatozóides ovinos contra danos determinados pelo choque térmico (García-López *et al.*, 1996) e de elevar taxas de prenhez obtidas de ovelhas inseminadas com sêmen congelado (Kareta *et al.*, 1972). Estas evidências subsidiam a viabilidade da utilização do PS como aditivo ao sêmen ovino congelado, bem como justificam novos estudos que avaliem o emprego do PS heterólogo como

estratégia para aumentar a viabilidade espermática e os índices de fertilidade, a partir da IA cervical.

A escassez de informações relacionadas ao uso do PS de eqüinos e bovinos como aditivo ao sêmen ovino congelado, bem como a necessidade de informações complementares relacionadas ao grau de homologia das proteínas constituintes do PS de ovinos, eqüinos e bovinos, justificam plenamente o desenvolvimento deste estudo.

3 CAPÍTULO ÚNICO

*Adição de plasma seminal heterólogo como estratégia para aumentar a
fertilidade do sêmen ovino congelado*

Artigo a ser submetido a periódico científico.

Abstract

The decrease of the spermatic viability of the ovine semen, due to freezing, can be attenuated with the addition of seminal plasma (PS). As heterologous seminal plasma is easy to obtain and reduce the sanitary risks/hazards, its use should be further evaluated. With this purpose, 3 experiments were carried out. Experiment 1: thawed semen was diluted in medium without PS (SPS) or containing 25% of ovine PS (PSO), equine PS (PSE) or bovine PS (PSB). The exposure to PS lasted 5 minutes or 6 hours. Motility, plasmatic membrane integrity, and proportion of live spermatozoa were evaluated. Experiment 2: molecular weight of the proteins in the PSO, PSE, and PSB were determined. Experiment 3: the spermatic DNA integrity (Neutral Comet Assay) was assessed for each treatment of experiment 1. The exposure for 5 minutes in PSO, PSE, or PSB conferred a positive effect on the viability parameters evaluated. The 6 hour exposure reduced the spermatic motility in the PSO and PSE groups in comparison to the control and PSB. The plasmatic membrane integrity was not affected by the treatments. The total protein concentration in the PSO, PSE, and PSB was, respectively, 16.8, 3.0, and 25.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The PSO and PSB presented similar protein profile, whereas the PSE showed others than 14 and 20KDa bands. After 1 hour of incubation, the lowest DNA fragmentation was obtained with fresh semen (SF), without difference among the

other groups. With 6 hours of incubation, the control (63%) and the thawed (70%) groups presented higher degree of fragmentation in relation to the SF (50%), with no difference among the PSO (60%), PSB (55%), and PSE (52%) treatments. In conclusion, the heterologous PS, even when presenting distinct protein profile, can be used as substitute to PSO. In addition, the ovine semen presents an elevated DNA fragmentation incidence.

Keywords: DNA fragmentation, insemination, Neutral Comet Assay, SDS-PAGE

3.1 Introdução

A eficácia da IA cervical com sêmen fresco ou resfriado está consolidada com base em numerosos trabalhos (Maxwell & Salamon, 1993; Donovan et al., 2004; Anel et al., 2006). Entretanto, com sêmen congelado a inseminação cervical proporciona resultados extremamente inconsistentes (O'Meara et al., 2005; O'Meara et al., 2007; El-Hajj Ghaoui et al., 2007a). A baixa viabilidade seminal observada no pós-descongelamento está condicionada a alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais determinadas pelo processamento seminal, incluindo a diluição, o resfriamento, o armazenamento, o congelamento e o reaquecimento espermático, que atuam perturbando a homeostasia espermática (Thibault, 1993).

A despeito dos efeitos negativos determinados pelo processo de criopreservação, o uso de sêmen congelado é indispensável para maximizar o ganho genético com a IA. Entretanto, para o emprego de sêmen congelado é imprescindível a adequação de protocolos que minimizem as crioinjúrias, prolongando a viabilidade espermática após o descongelamento.

Dentre as estratégias já testadas, o uso de plasma seminal (PS) mostrou-se eficaz para a proteção e reversão de grande parte dos danos celulares causados durante a criopreservação (Maxwell et al., 1999; Barrios et al., 2000; El-Hajj Ghaoui et al., 2007b). Entretanto, limitações referentes ao reduzido volume do ejaculado do carneiro e o risco de transmissão de doenças espécie específicas são importantes entraves para o uso do PS homólogo. Uma alternativa a ser considerada é o uso de PS de espécies de maior porte que proporcionem ejaculados de maior volume viabilizando a formação de bancos de PS, bem como permitam contornar os riscos sanitários decorrentes do uso de PS homólogo. A escassez de informações relativas ao uso do PS de bovinos e eqüinos como aditivo ao sêmen ovino descongelado, justificam a execução deste trabalho, que tem por objetivos: (a) determinar mediante avaliações *in vitro* a capacidade do PS eqüino (PSE) e bovino (PSB) em preservar a viabilidade do sêmen ovino descongelado, comparando-a com o PS ovino (PSO); (b) avaliar, através de eletroforese, o perfil das proteínas presentes no PSO, PSE e PSB, e adicionalmente; c) quantificar e comparar a fragmentação do DNA de espermatozóides incubados ou não com PSO, PSE ou PSB.

3.2 Materiais e Métodos

Delineamento experimental

O estudo foi composto de três experimentos. No experimento 1 foi avaliada a viabilidade espermática após o descongelamento de sêmen ovino adicionado de PSO, PSE ou PSB, com dois tempos de incubação. No experimento 2 foi determinada a concentração protéica total, por meio de espectrofotometria direta, e o peso molecular das proteínas presentes no PSO, PSE e PSB, através de SDS-PAGE. No experimento 3 quantificou-se e comparou-se o nível de fragmentação do DNA de espermatozóides

frescos ou congelados, incubados ou não com PSO, PSE ou PSB, por meio do *Neutral Comet Assay (NCA)*.

Animais e locais de realização dos procedimentos

O plasma seminal utilizado nos experimentos foi coletado de cinco garanhões da raça Crioula, pertencentes à Cabanha Del Piá (Balneário Camboriú/SC), cinco touros, sendo quatro da raça Jersey e um da raça Holandês Preto e Branco, alojados na Central de Inseminação Artificial da Companhia de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC – Indaial/SC) e oito carneiros, sendo quatro da raça Texel e quatro da raça Suffolk, pertencentes à Cabanha Estância Velha (Curitibanos/SC), dos quais também foi obtido o sêmen empregado nos estudos de criopreservação.

Obtenção e preparação do plasma seminal

Os machos ovinos, eqüinos e bovinos foram submetidos à coleta de sêmen durante o mês de janeiro (fotoperíodo longo), com o emprego de vagina artificial. Logo após a obtenção do sêmen, foi avaliada a viabilidade espermática, sendo utilizados apenas os ejaculados que apresentaram aspecto, vigor e motilidade espermática progressiva compatíveis com os padrões mínimos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry et al., 1998).

A seguir, os ejaculados foram submetidos a centrifugações sucessivas, três em média, até não haver formação de precipitado. Após 20 min de centrifugação a 5000 rpm (Centrífuga Fanem Baby[®]), o pellet formado era descartado e o sobrenadante re-

centrifugado nos ciclos subsequentes. Em seguida foi constituído um *pool* com volumes proporcionais de PS dos diferentes ejaculados. O *pool* de PS de cada espécie foi fracionado, armazenado a -20°C e utilizado para a realização dos experimentos que compõem este estudo.

Congelamento do sêmen ovino

As coletas de sêmen destinadas ao congelamento foram procedidas durante o mês de fevereiro (fotoperíodo longo). Dois ejaculados de cada um dos oito carneiros do estudo foram coletados com o uso de vagina artificial para a formação de um *pool*. Logo após a coleta, o sêmen foi diluído na proporção 1:1 em meio TRIS–gema glicerolado (Evans e Maxwell, 1987), com a imediata inicialização da curva de resfriamento ($0,25$ a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min} = 1,5$ horas) até 5°C , temperatura na qual o sêmen permaneceu em estabilização por 2 horas. Em seguida foi procedido o envase do sêmen, em ambiente refrigerado, em um sistema estabelecido com o objetivo de dinamizar o uso de PS, especialmente nas etapas de descongelamento e homogeneização do sêmen com o PS. Para o envase, foram utilizadas palhetas finas ($0,25$ mL), com 250×10^6 espermatozoides/palheta ($160 \mu\text{L} \approx 75\%$), seguido de uma coluna de ar de 1 cm para separar o sêmen do PS ou do diluente ($50 \mu\text{L} \approx 25\%$), de acordo com cada tratamento (Figura 1).

Imediatamente após o envase e vedação com álcool polivinílico, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (N_2), durante 8 min, antes de sua imersão em N_2 . Esta metodologia foi previamente validada (dados não publicados) em um pré-experimento. Duas palhetas de cada tratamento foram avaliadas para determinação da

viabilidade do sêmen em cada partida. Foram utilizadas apenas as partidas que apresentaram motilidade progressiva $\geq 40\%$, suficiente para a obtenção de uma dose inseminante de no mínimo de 100×10^6 espermatozoides móveis por palheta.

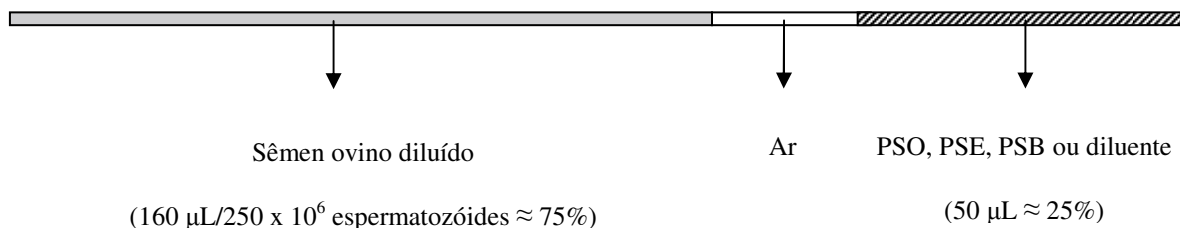


Figura 1: Sistema de envase do sêmen, PS e diluente em palhetas de 0,25 mL.

Experimento 1 – Determinação *in vitro* da viabilidade espermática

Foram realizadas três repetições, cada qual com o descongelamento de três palhetas de cada partida de congelamento. Em cada repetição, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 seg e agitadas manualmente para a homogeneização das diferentes frações contidas no seu interior. Alíquotas de sêmen descongelado não expostas (SPS), ou expostas a 25% de PSO, PSE ou PSB por um período de 5 min (Grupo Parcial - GP) ou durante todo o tempo de incubação (6 h) em banho-maria a 37°C (Grupo Integral – GI). No grupo GP, após o período parcial de incubação foi procedida a re-diluição espermática em meio Tris-gema não-glicerolado (Evans e Maxwell, 1987) na proporção 1:65, para a obtenção de 20×10^6 espermatozoides/mL. No grupo GI, o sêmen foi descongelado, homogeneizado e imediatamente diluído em meio Tris-gema não glicerolado sem PS (SPS) ou contendo

25% de PSO, PSE ou PSB, também com uma concentração ajustada para 20×10^6 espermatozoides/mL

A viabilidade espermática foi avaliada a cada 2 h, sendo determinados os parâmetros de motilidade; proporção de espermatozoides vivos e mortos, através da coloração supra-vital de eosina-nigrosina (Chalah et al., 1998); e a integridade funcional da membrana plasmática, através do teste hiposmótico (Correa & Zavos, 1992).

Experimento 2 – Avaliação do perfil eletroforético do PSO, PSE e PSB

Mediante espectrofotometria direta foi determinada a concentração protéica total presente no PSO, PSE e PSB, segundo a metodologia preconizada por Bradford (1976). O grau de semelhança entre as proteínas presentes no PSO, PSE e PSB, com base no peso molecular, foi determinado com o emprego da técnica de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o método proposto por Lodish (1995).

O procedimento SDS-PAGE foi realizado a partir de amostras com concentração protéica padronizada, mediante diluição em água bidestilada, para a obtenção de 25 µg de proteínas do PSO, PSE ou PSB. Imediatamente após a esse ajuste, foi adicionado uma solução tampão (Tris-HCl 0,6173 M - pH 6,8; β-mercaptoetanol 2 M; 10% SDS; 0,1% azul-de-bromofenol em água) na proporção 1:1 para todas as amostras, que foram então aquecidas a 90°C por 5 min, para a desnaturação protéica.

A eletroforese foi realizada no sistema BIO-RAD Mini-Protean 4 Cell (Bio-Rad Laboratories, USA) com uma corrente constante de 25 mA, por 2 h, e o gel de

poliacrilamida foi preparado a uma concentração de 17%. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o SDS-PAGE Molecular Weight Broad Range (Bio-Rad Laboratories, USA). O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue por um período de 4 h e descorado com o uso de uma solução de 45% metanol:água (v/v) e 10% de ácido acético, também por 4 h.

Experimento 3 – Determinação da taxa de fragmentação do DNA espermático

As mesmas amostras de PS e sêmen utilizadas nos Experimentos 1 e 2, foram empregadas nesse experimento. A integridade do DNA espermático foi determinada através do método *Neutral Comet Assay*, proposto por Linfor & Meyers (2002) e adaptado para avaliação de espermatozóides de carneiro, com alterações no preparo das lâminas bem como das soluções de lise e eletroforese, descritas abaixo.

O sêmen ovino foi descongelado, incubado ou não em 25% PSO, PSE ou PSB por 5 min e, imediatamente após, submetido ao método de seleção espermática *swim up* para selecionar apenas a população espermática móvel e assim avaliar apenas os espermatozóides aptos para a fecundação. Em adição, três outros tratamentos não submetidos ao procedimento *swim up* foram avaliados: 1) sêmen descongelado (SD); 2) sêmen fresco diluído em meio TRIS (SF); e 3) sêmen fresco incubado em uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 400 µM, representando o controle positivo (CP).

Uma amostra de 100 µL do sêmen a ser avaliado foi depositada em um tubo de 1,5 mL (Eppendorf®), contendo 500 µL de meio TRIS-glicose-ácido cítrico. Após 1 h de incubação a 37°C, 450 µL do sobrenadante foi removido e utilizado para avaliação da fragmentação do DNA espermático.

Preparação das lâminas: Inicialmente foram preparadas duas soluções de agarose a 0,5% em tampão TBE (TRIS - 54 g/L; ácido bórico - 27,5 g/L; N₂EDTA - 0,5 M): uma de ponto de fusão normal (solução 1) e outra de baixo ponto de fusão (solução 2). A confecção das lâminas consistiu, inicialmente, no espalhamento de 300 µL da solução 1 e posterior secagem em estufa a 40°C. Para a composição da segunda camada de agarose, 5 µL de espermatozóides ressuspensos em solução TRIS-glicose-ácido cítrico (10⁶ espermatozóides/mL) foram homogeneizados com 95 µL da solução 2. Posteriormente, 50 µL dessa combinação foram depositados sobre a primeira camada de gel, cobertos com uma lamínula de 24 x 50 mm e mantidos a 5°C por 15 min, para solidificação. Após a remoção cuidadosa da lamínula, uma terceira camada de agarose composta apenas pela solução 2 foi depositada, coberta com lamínula e refrigerada a 5°C também por 15 min.

Soluções de lise e eletroforese: As soluções foram preparadas momentos antes do uso. Imediatamente após a solidificação da terceira camada de gel e remoção da lamínula, as lâminas foram cuidadosamente imersas na primeira solução de lise, constituída de 2,5 M NaCl, 100 mM N₄EDTA, 10mM TRIS base (pH 10), 1% de Triton X-100 e 1% de Lauril-sarcosina, onde permaneceram incubadas durante 2 h a 5°C. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para a segunda solução de lise, constituída de NaCl 2,5 M, TRIS base 5 mM (pH 7,4), Lauril-sarcosina 0,5% e de RNase A 20µg/mL, durante 4 h a 37°C. Por último, as lâminas foram incubadas por 12 h a 37°C na terceira solução de lise, constituída de 2,5 M NaCl, 5 mM TRIS base (pH 7,4), 40 mM dithiothreitol e 200 µg/mL de proteinase K. Ao término da lise espermática, as lâminas foram submetidas a três banhos consecutivos em água destilada, de 20 min cada. Em seguida, as lâminas foram alocadas uniformemente no tampão TBE (pH 8,0) para eletroforese, onde

permaneceram durante 20 min. A eletroforese foi conduzida por 60 min a 120 mA, utilizando-se o sistema BIO-RAD Mini-Protean 4 Cell (Bio-rad Laboratories, USA). Ao término da eletroforese, as lâminas foram lavadas em água destilada, mantidas no sentido vertical para a drenagem da água por 30 min, fixadas em álcool 92°GL durante 5 min e secadas à temperatura ambiente por 60 min. As lâminas foram coradas com 50 µL de brometo de etídio (50 µg/mL), cobertas com uma lamínula, e a leitura foi realizada sob luz ultravioleta, em microscópio de epifluorescência. A fragmentação do DNA espermático foi classificada como positiva ou negativa (Linfor & Meyers, 2002), com base na presença ou ausência de uma cauda formada pela migração dos fragmentos de DNA, que compõem um perfil semelhante ao de um cometa.

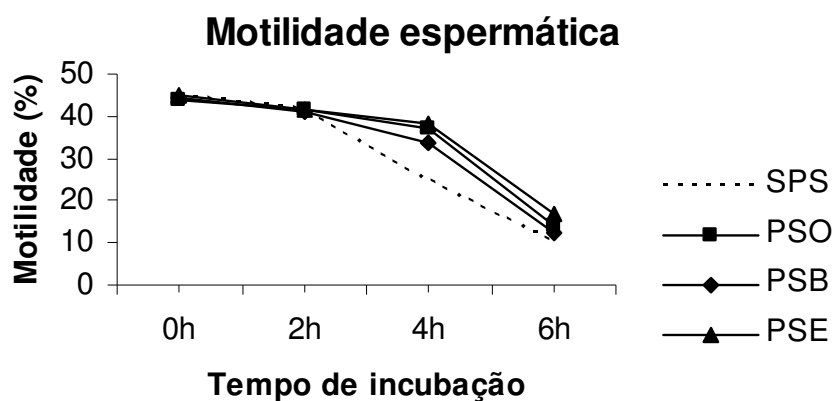
Análise estatística

Os resultados percentuais dos parâmetros de motilidade, integridade de membrana plasmática e espermatozóides vivos, obtidos no Experimento 1, foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas no tempo, através do PROC MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). As taxas de fragmentação do DNA espermático, obtidas no Experimento 3, foram analisadas pelo Teste do χ^2 usando o pacote estatístico Minitab (State College, EUA), com nível de significância de 5%.

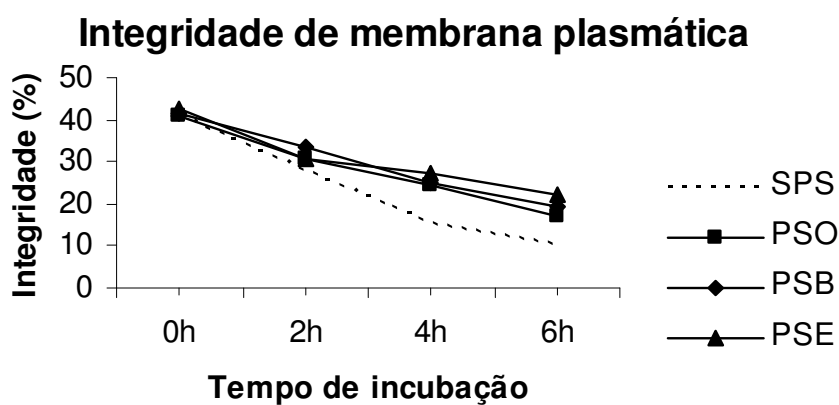
3.3 Resultados

No Experimento 1, observou-se um comportamento distinto das amostras em relação ao tempo de incubação parcial (GP) ou integral (GI) em PS. A incubação por 5 min (grupo GP) mostrou ser mais adequada, sendo observado um efeito benéfico com a incubação dos espermatozóides ovinos em PSO, PSE ou PSB (Figura 2). Além disso, foi verificado um comportamento bastante uniforme dos distintos PS utilizados. Em relação à motilidade espermática (Figura 2a), com exceção do PSB que foi semelhante, os demais tratamentos do GP apresentaram resultados superiores ao controle SPS na avaliação de 4 h. Entretanto, com 6 horas de incubação não houve diferenças entre os tratamentos. Os parâmetros, integridade funcional de membrana plasmática (Figura 2b) e percentual de espermatozóides vivos (Figura 2c) foram superiores ($P < 0,05$) nos tratamentos PSO, PSE e PSB a partir de 2 h de incubação quando comparados ao grupo controle SPS, mantendo-se assim também na avaliação de 6 h.

(a)



(b)



(c)

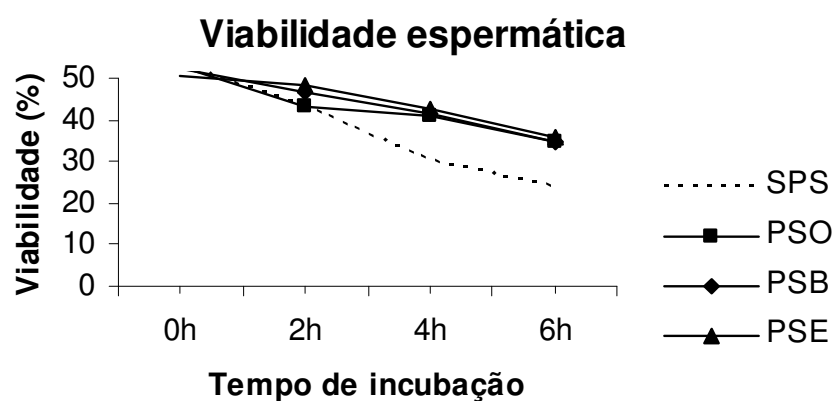


Figura 2. Motilidade (a), integridade funcional de membrana plasmática (b) e percentual de espermatozoides vivos (c) do grupo GP (Grupo parcial) não incubados (SPS) ou incubados por 5 min em solução contendo 25% de plasma seminal ovino (PSO), bovino (PSB) ou equino (PSE) e, em seguida mantidos à 37°C por 6 h.

A incubação efetuada por tempo mais prolongado (GI) apresentou efeitos deletérios, em geral, observados na avaliação efetuada com 2 h de incubação (Figura 3). Neste grupo as amostras com PSE apresentaram uma redução significativa ($P < 0,05$) da motilidade espermática com 2 h de incubação (25,0%), que caiu ainda mais na avaliação efetuada com 4 h (10,0%). Ainda no GI, a adição de PSO, embora não tenha afetado a motilidade espermática com 2 h de incubação (43,3 vs 41,7%), determinou sua redução com 4 h de incubação (13,3%), de forma semelhante ao observado com PSE. Por sua vez, a adição de PSB não exerceu influência na motilidade espermática em relação ao SPS (Figura 3a). Em relação à integridade funcional de membrana plasmática (Figura 3b), houve um comportamento distinto dos diferentes tipos de PS. Com 2 h de incubação foi observada uma redução ($P < 0,05$) da integridade de membrana do grupo exposto ao PSE (22,7%) em relação aos demais grupos avaliados no mesmo momento (28,3% a 31,7%). Porém, a partir desta avaliação o PSE proporcionou a manutenção das taxas de integridade de membrana e, com 4 h de incubação a avaliação de todos os grupos não diferiu (13,3% a 19,7%). Com 6 h de incubação, foi verificada uma inversão dos resultados obtendo-se os melhores percentuais de integridade de membrana com a exposição ao PSE (19,7%) que, no entanto, não diferiu do PSB (17,7%). Na avaliação de espermatozóides vivos (Figura 3c), houve pequena variação entre os diferentes tratamentos do GI. A incubação integral com 25% de PSB proporcionou um aumento ($P < 0,05$) do percentual de espermatozóides vivos na avaliação realizada com 4 e 6 h de incubação.

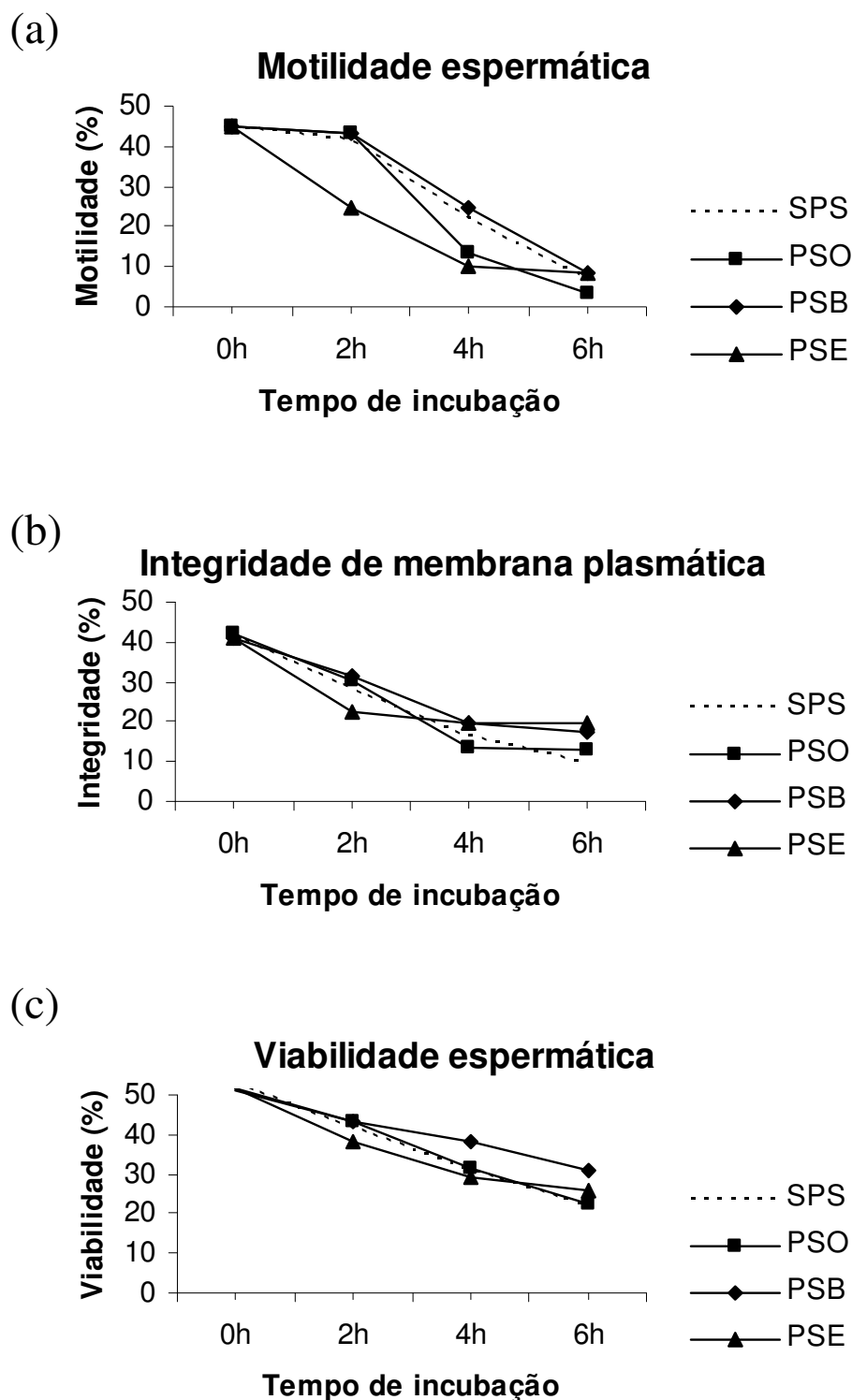


Figura 3: Motilidade (a), integridade funcional de membrana plasmática (b) e percentual de espermatozoides vivos (c) do grupo GI (Grupo integral), incubados em 25% de plasma seminal ovino (PSO), bovino (PSB) ou equino (PSE), durante 6 h à 37°C.

No Experimento 2, a concentração protéica total encontrada no PSO, PSE e PSB foi de 16,8; 3,0; e 25,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. O perfil eletroforético destas proteínas, comparado mediante SDS-PAGE (Figura 4), foi semelhante entre o PSO e PSB, especialmente no que se refere à expressão de bandas protéicas com peso aproximado de 14 KDa. O PSE exibiu um perfil protéico distinto daquele encontrado no PSO e PSB. Sobretudo, varias bandas com perfil distinto foram visualizadas no PSE, no intervalo de 6 a 50 KDa, em comparação com o PSO e PSB.

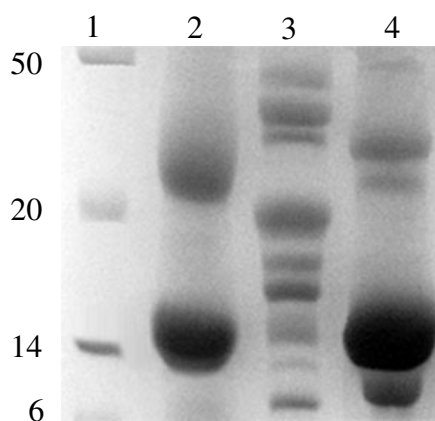


Figura 4: Perfil protéico do PSO, PSE e PSB, realizado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 17%, com amostras padronizadas para obtenção de 25 μg de proteína/poço. Linha 1 - marcador de peso molecular (BioRad Broad Range); Linha 2 – PSO; Linha 3 – PSE; Linha 4: PSB.

No Experimento 3 observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da fragmentação do DNA, da primeira para a sexta hora de incubação (Figura 5), nos tratamentos SF, SD, SPS, PSO e PSB. Em contrapartida, o percentual de fragmentação do tratamento PSE (40% e 52%) não foi afetado pelo tempo de incubação de 1 para 6 horas. Na avaliação efetuada com 1 h de incubação (Figura 5), o menor nível de

fragmentação do DNA espermático foi observado com o tratamento SF (24%), que diferiu ($P < 0,05$) dos demais tratamentos. Ainda, neste momento de avaliação não houve diferença ($P > 0,05$) entre os demais tratamentos submetidos ou não ao *swim up*, ou entre os tratamentos SPS, SD, PSO, PSE e PSB.

Na avaliação com 6 h de incubação (Figura 5), as taxas de fragmentação dos tratamentos SPS (63%) e SD (70%) foram significativamente superiores ao tratamento SF (50%). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos PSO (60%), PSB (55%) e PSE (52%).

Fragmentação do DNA espermático

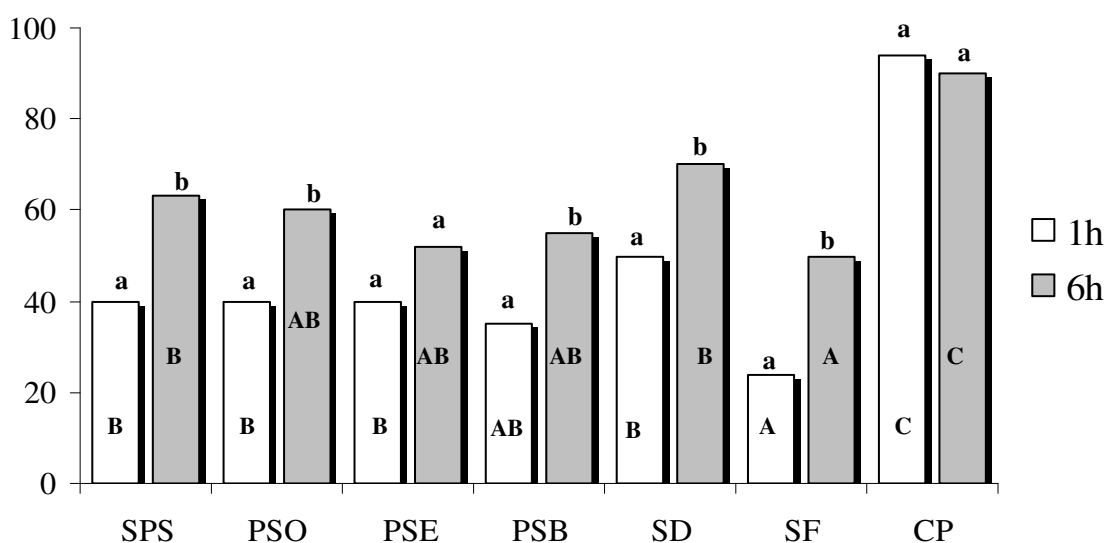


Figura 5 - Fragmentação do DNA de espermatozoides ovinos descongelados, adicionados de plasma seminal ovino (PSO), equino (PSE), bovino (PSB), por 5 min, ou sem plasma seminal (SPS) e selecionados por *swim up*.

SD = sêmen descongelado; SF sêmen fresco; CP = controle positivo incubado em 400 μ M de H_2O_2 .

ABC: letras distintas indicam diferença entre tratamentos com 1 h de incubação.

ONZ: letras distintas indicam diferença entre tratamentos com 6 h de incubação.

ab: letras distintas indicam diferença entre 1 h e 6 h de incubação dentro de cada tratamento ($P < 0,05$).

Adicionalmente, o CP apresentou os maiores percentuais de fragmentação com 1 h (94%) bem como com 6 h de incubação (90%), que foram significativamente superiores aos demais tratamentos.

3.4 Discussão

O PS tem sido explorado como aditivo ao sêmen congelado para melhorar a viabilidade espermática de diferentes espécies (Graham et al., 1994; El-Hajj Ghaoui et al., 2007a; Topfer-Petersen et al., 2005). Entretanto, os resultados são contraditórios (Manjunath et al., 2002; El-Hajj Ghaoui et al., 2007b; O'Meara et al., 2007), sugerindo que o seu uso em programas de IA ainda depende da adequação do protocolo de utilização. O PS heterólogo soluciona ao menos uma parte dos problemas inerentes ao uso do PSO. O maior volume de PS obtido na coleta de machos de espécies de grande porte, associado ao menor risco de transmissão de doenças, principalmente as espécie-específicas, são características importantes que sugerem o seu emprego.

Em condições naturais, após a ejaculação, os espermatozoides ovinos passam por uma gradual redução da concentração do PS, seja por sua diluição nas secreções vaginais e uterinas ou pelo avanço dos espermatozoides através da cérvix e útero (Senger, 2003). Esta dinâmica atua modulando a atividade espermática e, conseqüentemente, é possível que também em condições artificiais o tempo de exposição ao PS possa influenciar a viabilidade espermática. Desta forma, o GP foi delineado com o objetivo de mimetizar, *in vitro*, a condição na qual os constituintes do PS são diluídos ao longo do trato genital feminino. Em adição, o sistema de envase de sêmen estabelecido neste trabalho dinamizou a utilização de PS em associação ao sêmen

ovino congelado, além de proporcionar um método prático para uso em programas de IA. O envase em palhetas finas (0,25 mL) possibilitou, no pós-descongelamento, a obtenção de uma concentração de espermatozóides móveis apropriada para a IA cervical em ovinos, com o armazenamento do PS na própria palheta. Este sistema elimina entraves como a centrifugação, o excessivo volume na dose inseminante, bem como o longo tempo decorrido desde o descongelamento do sêmen até a IA, que têm sido responsabilizados pelos resultados inconsistentes obtidos a partir da adição de PS homólogo ao sêmen ovino (El-Hajj Ghaoui et al., 2007b; O'Meara et al., 2007), na inseminação cervical.

Neste estudo, a exposição previa de espermatozóides ovinos ao PSO, PSE ou PSB, por apenas 5 min, melhorou os parâmetros de motilidade, integridade funcional de membrana plasmática e taxa de espermatozóides vivos, demonstrando que este protocolo pode ser mais fisiológico e adequado. Estes resultados confirmam observações prévias referentes à adesão de componentes seminais benéficos na superfície espermática, mesmo com um reduzido tempo de exposição (Desnoyens & Manjunath, 1992; García-López et al., 1996). A incubação por apenas 5 min se mostrou mais adequada do que a realizada por períodos prolongados (2 a 6 h), corroborando evidências de que o tempo modula a interação funcional entre os constituintes do PS e a superfície espermática (Manjunath et al., 2002).

Entretanto, a incubação de sêmen ovino descongelado por longo período (até 6 h), adicionado de 25% de PSO ou PSE, reduziu a motilidade espermática, confirmando estudos anteriores que empregaram PSO ou PSE como aditivo ao sêmen ovino (Graham, 1994) e equino (Love et al., 2005), respectivamente. Porém, a adição de PSO, PSE ou PSB, não exerceu influência na integridade funcional da membrana plasmática

ou na taxa de espermatozóides vivos, em relação ao controle SPS. Estes dados sugerem que a incubação de espermatozóides ovinos com PS por períodos prolongados não é eficiente na preservação de sua viabilidade, podendo inclusive resultar em sua redução. É possível que alguns fatores presentes no PS se tornem prejudiciais com o passar do tempo, podendo exercer efeitos negativos sobre a viabilidade espermática. Sabe-se que repetidas coletas de sêmen elevam as concentrações de sódio e potássio no PSO (Kaia et al., 2002) e níveis elevados de sódio são naturalmente encontrados no PSE (Mann et al., 1981). A concentração elevada dos íons sódio e potássio são prejudiciais à motilidade espermática (Álvarez et al., 1883; Kaya et al., 2002), além de favorecerem alterações como a peroxidação lipídica e a desestabilização da cromatina espermática (Alvarez et al., 1883; Ferrandi et al., 1992). Estes dados podem justificar a menor motilidade e integridade funcional de membrana plasmática, observadas com 2 h de incubação em PSO ou PSE, neste estudo.

A exposição prolongada ao PS (Experimento 1) proporcionou ainda uma grande variabilidade nos resultados observados nos distintos tempos de incubação e nas diferentes avaliações. Essa variabilidade pode ter estado condicionada à composição bioquímica instável do PS (Dominguez et al., 2008), bem como aos efeitos variáveis que o mesmo exerce sobre a vitalidade espermática (Perez-Pé et al., 2001; Marti et al., 2007). Alguns estudos prévios demonstraram evidências da presença de componentes seminais que interferiram na adesão e função das proteínas do PS (García-López et al., 1996; Ollero et al., 1997; Cardoso et al., 2006). Infelizmente ainda não é possível controlar a alocação dos componentes benéficos, maléficos ou inertes presentes do PS.

O embasamento para o uso de PS heterólogo consiste em uma aparente homologia entre proteínas do PSB e PSO (Thérien et al., 1995; Jobim et al., 2005;

Bergeron et al., 2005) e entre o PSB e PSE (Calvete et al., 1997, Brandon et al., 1999). Estas proteínas são tidas como responsáveis pelos efeitos benéficos do PS (Manjunath et al., 1994; Thérien et al., 1998; Topfer-Petersen et al., 2005; Barrios et al., 2005; Jobim et al., 2005; Cardoso et al., 2006). A caracterização das proteínas presentes no PS de ovinos, bovinos e eqüinos e suas similaridades, poderiam predizer sua capacidade protetora. No PSO, já foram identificadas as proteínas RSP14 e RSP20, que preservam a integridade da membrana plasmática e revertem danos oriundos do choque térmico (Barrios *et al* 2005), além de favorecer a manutenção do estado decapitado do espermatozóide (Pérez Pé et al., 2001). A comparação do perfil eletroforético das proteínas entre PSO, PSE e PSB realizada neste estudo, mostrou semelhança entre PSO e PSB (Figura 4). Desta forma, o efeito positivo proporcionado pela adição de PSO ou PSB no Experimento 1, sugere que seus constituintes atuam de forma semelhante, prolongando a viabilidade de espermatozóides ovinos.

Entretanto, o PSE exibiu várias bandas com peso molecular intermediário e perfil distinto, em relação ao PSO e PSB. Esta discrepância foi surpreendente diante do consistente efeito benéfico observado com a incubação dos espermatozóides ovinos por 5 min em PSE. Uma possível explicação pode ser o fato de que a maioria das proteínas encontradas no PS de ovinos, bovinos e eqüinos pertence a classes protéicas similares, como as *Fn-2 type proteins*, *Spermadhesin proteins* e *CRISP proteins* (Manjunath et al., 1994; Thérien et al., 1998; Topfer-Petersen et al., 2005), indicando a co-existência de proteínas estrutural e funcionalmente semelhantes no PS de diferentes espécies.

Estudos sugerem que a adição de proteínas do PS sob uma forma purificada oferece uma maior segurança na proteção espermática (García López et al., 1996; Barrios et al., 2000; Barrios et al., 2005). Entretanto, além das dificuldades inerentes à

identificação e purificação das diferentes proteínas que constituem o PS, é possível que outros constituintes não protéicos também exerçam influência sobre a viabilidade espermática. A reduzida concentração protéica presente no PS dos eqüinos sugere que constituintes não protéicos, como antioxidantes, moléculas inibidoras de proteases e fatores de crescimento que promovam a longevidade espermática (Topfer-Petersen et al., 2005), podem ter contribuído para a obtenção dos resultados benéficos observados neste estudo com a exposição por 5 min ao PSE.

Muito embora os parâmetros de avaliação utilizados neste estudo (motilidade, integridade funcional de membrana plasmática e sobrevivência espermática) sejam de uso comum, os mesmos são subjetivos e não garantem a capacidade fecundante dos espermatozóides aprovados nestes critérios. Nesse sentido, a avaliação espermática mais adequada consiste na determinação de taxas de prenhez que, todavia, não é freqüentemente empregada devido ao custo elevado e à necessidade de uma ampla estrutura. Um método promissor para avaliar a viabilidade espermática é determinar a integridade de seu DNA.

O método *Neutral Comet Assay*, previamente descrito para espermatozóides bovinos (Boe-Hansen et al, 2005), eqüinos (Linfor e Meyers 2002) e suínos (Fraser et al., 2005) não se mostrou adequado para utilização com ovinos (dados não publicados). Desta forma, a metodologia descrita para estas espécies foi modificada para avaliação de espermatozóides ovinos. Os resultados obtidos neste estudo (Experimento 3), com o controle positivo apresentando 94% e 90% de fragmentação de DNA com 1 e 6 h de incubação, respectivamente, validam a técnica desenvolvida para sêmen ovino. Como esperado, o sêmen fresco apresentou a menor taxa de fragmentação (24%) com 1 h de incubação. Entretanto, mesmo o sêmen fresco apresentou uma elevada taxa de

fragmentação com 6 h de incubação (50%), o que demonstra a suscetibilidade do sêmen ovino ao estresse oxidativo, especialmente se comparado a outras espécies (Linfor & Meyers, 2002; Urrego et al., 2008).

Como o PS de diferentes espécies é composto por antioxidantes naturais (Senger, 2003), sua adição representa uma real possibilidade de redução da fragmentação do DNA espermático causada pela ação dos radicais livres, principalmente após o descongelamento. Os resultados obtidos no Experimento 3 demonstram que a adição de 25% de PSO, PSE ou PSB não foi ineficaz em preservar a integridade do DNA espermático, após 1 ou 6 h de incubação em banho-maria a 37°C, visto que os percentuais de fragmentação observados nos grupos PSO, PSE e PSB foram semelhantes ao observado no grupo SPS. Entretanto foi verificada uma tendência ($P=0,09$) na capacidade de reduzir as taxas de fragmentação do tratamento PSE (52%) em relação ao tratamento SD (70%). Embora seja apenas uma tendência, a diferença considerável entre as duas taxas de fragmentação (52% vs. 70%) pode exercer uma importância biológica relevante.

O método de seleção espermática *swim up*, incorporado ao Experimento 3, possibilitou a eliminação dos espermatozóides imóveis (mortos) que supostamente poderiam apresentar elevada taxa de fragmentação de DNA e assim proporcionar um desvio nos resultados. Esta suposição não foi confirmada nesse experimento, sendo que o grupo SPS, submetido ao procedimento de *swim up*, apresentou 63% de fragmentação que não diferiu dos 70% de fragmentação observados no grupo SD, não submetido ao *swim up*. Assim, os dados deste estudo possibilitam inferir que espermatozóides imóveis não apresentam maior taxa de fragmentação de DNA.

Em valores absolutos, a maior taxa de fragmentação de DNA foi observada nos espermatozóides descongelados (SD) sem qualquer aditivo. Estes resultados podem ser explicados pelos danos espermáticos sofridos durante a criopreservação do sêmen, freqüentemente associados à formação de radicais livres (Baumber et al., 2003), que por sua vez intensificam a fragmentação do DNA espermático bem como afetam os parâmetros de motilidade, integridade funcional de membrana plasmática e a capacidade de fusão espermático oocitária (Aitken et al., 1998). Sobretudo, espermatozóides ovinos são particularmente sensíveis à peroxidação lipídica, devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados presentes na sua composição (Baumber et al., 2003).

As informações obtidas neste estudo criam novas perspectivas para a obtenção de melhores resultados a partir do sêmen ovino congelado, com a possibilidade do uso de PS eqüino ou bovino em substituição ao PS ovino, dinamizando o uso deste aditivo. Adicionalmente, uma nova estratégia foi validada com a real possibilidade de incorporação do método *Neutral Comet Assay* na avaliação espermática de ovinos.

Por fim, estudos *in vivo* devem ser realizados para avaliar os efeitos da adição de PS heterólogo ao sêmen ovino descongelado, sobre as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas pela via cervical.

3.5. Conclusões

- O plasma seminal bovino e eqüino pode ser utilizado para preservar a viabilidade do sêmen ovino congelado, em substituição ao plasma seminal ovino.

- A incubação de espermatozóides ovinos com plasma seminal ovino, bovino ou eqüino foi influenciada pelo tempo de exposição, com efeitos positivos em incubações por tempo parcial.
- O plasma seminal eqüino apresentou uma menor concentração protéica que o plasma seminal bovino e ovino.
- Em relação ao plasma seminal bovino e ovino, o plasma seminal eqüino apresenta diferenças no perfil eletroforético de suas proteínas, com a presença de bandas com perfil distinto entre 6 a 50 KDa.
- As modificações propostas no método *Neutral Comet Assay* possibilitaram validar o método para utilização com sêmen ovino.
- No sêmen ovino, a taxa de fragmentação de DNA não diferiu entre espermatozóides selecionados ou não pelo método *swim up*.
- Espermatozóides ovinos apresentaram uma elevada taxa de fragmentação, demonstrando sua suscetibilidade ao estresse oxidativo.
- A adição de PSO, PSE ou PSB não foi capaz de preservar a integridade do DNA espermático, após 1 ou 6 horas de incubação.

3.6 Referências bibliográficas

Aitken JR, Gordon E, Harkiss D, Twiggm JP, Milnem P, Zo J, Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidation stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59:1037–1046.

Alvarez JG, Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29:548–555.

Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E, Paz P. 2006. Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41:30–42.

Barrios B, Juan-Fernández M, Muiñp-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26:539-549.

Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, CebriaˆN-Prez Ja. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63:1531–1537.

Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. 2003. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24:621–628.

Bergeron A, Villemure M, Lazure, C, Manjunath, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Cell Biology and Biochemistry*, 71:461-470.

Boe-Hansen GB, Morris ID, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. 2005. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*, 63:1789–1802.

Bradford, MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Brandon CI, Heusnes GL, Caudle, AD, Fayrer-Hosken, RA. 1999. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, 52:863-873.

- Bucak MN, Tekin, N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73:103–108.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Toepfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *Federation of European Biochemical Societies*, 407:201-206.
- Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muinõ-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66:841–850.
- Chalah T, Brillard JP. 1998. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*, 3:487-493.
- Correa JR, Zavos PM. 1992. The Hyposmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate the Functional Integrity of the Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane. *Theriogenology*, 42:351-360.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, 267:10149–10155.
- Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69:564–573.
- Donovan A, Hanrahan JP, Kummen E, Duffy P, Boland MP. 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus. *Animal Reproduction Science*, 84:359–368.
- El-Hajj Ghaoui R, Gillian L, Thomson, PC, Evans G, Maxwell WMC. 2007a. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28:109-122.

El-Hajj Ghaoui R, Thomson PC, Leahy T, Evans G, Maxwell WMC. 2007b. Autologous Whole Ram Seminal Plasma and its Vesicle-free Fraction Improve Motility Characteristics and Membrane Status but not In Vivo Fertility of Frozen–Thawed Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 42:541–549.

Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, Sydney: Butterworths, 99.

Ferrandi B, Consiglio AL, Carnevali A, Porcelli F. 1992. Effects of lipid peroxidation on chromatin in rabbit and mouse spermatozoa: a cytochemical approach. *Animal Reproduction Science*, 29:89–98.

Fraser L, Strzezek J. 2005. Effects of Freezing–Thawing on DNA Integrity of Boar Spermatozoa Assessed by the Neutral Comet Assay. *Reproduction of Domestic Animals*, 40:530–536.

García-López N, Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1996. Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*, 680:137-143.

Graham JK. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41:1151-1162.

Henry M, Leite RC. 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte.

Jobim MIM, Oberst ER, Salbergo CG, Wald VB, Horn AP, Mattos RC. 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 63:2053-2062.

Kaya A, Aksoy T, Tekeli T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in ram. *Small Ruminant Research*, 44:153-158.

Linfor JJ, Meyers S. 2002. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell electrophoresis. *Journal of Andrology*, 23:107–113.

Lodish H. 1995. *Molecular Cell Biology*. 4 ed. W.H. Freeman: New York.

Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, 63:1584-1591.

Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. 2002. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biology of Reproduction*, 67:1250–1258.

Manjunath P, Souberand S, Chandonnet Luc, Roberts KD. 1994. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochemical Journal*, 303:121-128.

Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Berlin: Springer-Verlag.

Marti E, Mara L, Marti JI, Muinõ-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 67:1446–1454.

Maxwell WMC, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction Fertility Development*, 5:613–638.

Ollero M, Cebrian-Perez Ja, Muino-Blanco T. 1997. Improvement of Cryopreserved Ram Sperm Heterogeneity and Viability by Addition of Seminal Plasma. *Journal of Andrology*, 18:732-739.

O'Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans ACO, Lonergan P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*, 67:1262–1268.

O'Meara CM, Hanrahan JP, Donovan A, Fair S, Rizos D, Wade M, Boland MP, Evans ACO, Lonergan P. 2005. Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 64:1797–1808.

Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56:425-434.

Salamon S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62:77–111.

Senger PL. 2003. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2ed. Pullman, WA: Current conceptions. p. 373.

Thérien I, Bleau G, Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, 52:1372-1379.

Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1998. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of Reproduction*, 59:768–776.

Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF. 1993. *Reproduction in Mammals and Man* (Ed.). Paris: Ellipses

Topfer-Petersen E, Ekhlas-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*, 89:159–170.

Urrego R, Rios A, Angel MO, Camargo O. 2008. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el DNA de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana de Ciéncias Pecuárias*, 21:19-26.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Abney TO, William LW. 1970. Inhibition of sperm capacitation by intrauterine deposition of seminal plasma decapacitation factor. *Biology of Reproduction*, 2:14-17.

Aitken JR, Gordon E, Harkiss D, Twiggm JP, Milnem P, Zo J, Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidation stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59:1037–1046.

Alvarez JG, Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29:548–555.

Álvarez M. 2000. Estudio del cuello uterino en la oveja Churra como método de mejora de la vía vaginal en la inseminación artificial. Thesis Doctoral, Veterinary School, University of León, Spain.

Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E, Paz P. 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction of Domestic Animals*, 41:30–42.

Armstrong DT, Evans G. 1984. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 71:89-94.

Askari, HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. 1994. Effect of antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze–thaw process. *Archives of Andrology*, 33:11–15.

Aurich JE, Ktibne, JA, Hoppe, H, Aurichz C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 46:791-46797.

Baas JW, Molan PC, Shannon P. 1983. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68:275–280.

Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. 2003. Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41:13–19.

Barrios B, Juan-Fernández M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26:539-549.

Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63:1531–1537.

Berger T, Clegg E. 1985. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock. Initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. *Journal of Animal Science*, 60:1295–1302.

Bergeron A, Villemure M, Lazure, C, Manjunath, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Cell Biology and Biochemistry*, 71:461-470.

Brandon CI, Heusnes GL, Caudle, AD, Fayrer-Hosken, RA. 1999. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, 52:863-873.

Bucak MN, Ates A, Yuce A. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*, 75:128–134.

Bucak MN, Tekin, Necmettin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73:103–108.

Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. 1995. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosilation on its heparin-and gelatin-binding capabilities. *Biochemical Journal*, 310:615–620.

Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Toepfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *Federation of European Biochemical Societies*, 407:201-206.

Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muinõ-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66:841–850.

Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 59:451–458.

Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, 267:10149–10155.

Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69:564–573.

Donovan A, Hanrahan JP, Kummen E, Duffy P, Boland MP. 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus. *Animal Reproduction Science*, 84:359–368.

- Donovan A, Hanrahan JP, Lally T. 2000. AI For Sheep Using Frozen Thawed Semen. Project Report Faculty of Agriculture University College Dublin.
- Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G. 1994. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 36:211–225.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, Sydney: Butterworths, 99.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, Sydney: Butterworths, 99.
- Fraser L, Strzezek J. 2005. Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the Neutral Comet Assay. *Reproduction in Domestic Animals*, 40:530–536.
- García-López N, Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1996. Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*, 680:137-143.
- Garner DL, Thomas LCA, Gravance CG, Marshall CE, Dejarnette JM, Aallen CH. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, 5631-5640.
- El-Hajj Ghaoui R, Thomson PC, Leahy T, Evans G, Maxwell WMC. 2007. Autologous Whole Ram Seminal Plasma and its Vesicle-free Fraction Improve Motility Characteristics and Membrane Status but not In Vivo Fertility of Frozen–Thawed Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 42:541–549.
- Gillan L, Maxwell WMC. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54:271–283.
- Graham JK. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41:1151-1162.
- Gustafsson BK, Graham EF, Crabo BC, Pavelko MK, Wagner WC. 1977. Pre-freeze supplementation of ram semen with PGE1 and PGF2. Effect of sperm vitality in vitro and on sperm transport in the ewe. *Proceedings of 10th Animal Meeting Society*. Austin, Texas.
- Hall SM, Evans J, Haworth SG, 1993. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 9:106–114.

Hinkovska-Galcheva V, Peeva D, Momchilova-Pankova A, Petkova D, Koumanov K. 1980. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine derivatives, membrane fluidity and changes in the lipolytic activity of ram spermatozoa plasma membranes during cryopreservation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 20:867-871.

Jobim MIM, Oberst ER, Salbergo CG, Wald VB, Horn AP, Mattos RC. 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 63:2053-2062.

Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, De-Paz P, Anel L. 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*, 66:1876-1883.

Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in ram. *Small Ruminant Research*, 44:153-158.

Kareskoski AM, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 41:33-38.

Kareta W, Pilch J, Wierzbowski S. 1972. Fertility of frozen ram semen diluted in citrate buffer with or without added bull seminal plasma. *Proceedings of 7th International Congress of Animal Reproduction*. Munich, 3:1479-1484.

Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Sukanya Leethongdee KI, Wax G. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64:1225-1235.

Langford GA, Marcus GJ, Hackett AJ, Ainsworth L, Wolynetz MS, Peters HF. 1979. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. *Journal of Animal Science*, 59:685-691.

Lausmann C, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Bragança JFM, Oliveira, AK, Meyer AA. 2004. Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 28:150-157.

Lightfoot RJ & Salamon S. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. II. The effects of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. *Journal of Reproduction and Fertility*, 22:399-408.

Linfor JJ, Meyers S. 2002. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell electrophoresis. *Journal of Andrology*, 23:107-113.

López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálbez J. 2008. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology*, *in press*.

Lopyrin AI. 1971. *Biology of Reproduction in Sheep*. Kolos, Moscow, 320.

- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, 63:1584-1591.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. 2002. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biology of Reproduction*, 67:1250–1258.
- Manjunath P, Souberand S, Chandonnet Luc, Roberts KD. 1994. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochemical Journal*, 303:121-128.
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Berlin: Springer-Verlag.
- Marley PB, Richardson BA, Brown-Woodman PDC, Martin ICA, White IG. 1976. Prostaglandin supplementation of diluted ram semen in artificial insemination - preliminary studies. *Theriogenology*, 6:655, abstract.
- Marti E, Mara L, Marti JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 67:1446–1454.
- Maxwell WMC. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronised oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Animal Reproduction Science*, 10:309–316.
- Maxwell WMC, Johnson LA. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52:1353-1362.
- Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, Mcfhye CA. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 11:123–126.
- Maxwell WMC, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction Fertility Development*, 5:613–638.
- Maxwell WMC, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42:55–65.
- Meghan C, Wulster-Radcliffe SW, Gregory SL. 2004. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62:990–1002.
- O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa. *Journal of Andrology*, 29:269–275.

O'Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans ACO, Lonergan P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*, 67:1262–1268.

O'Meara CM, Hanrahan JP, Donovan A, Fair S, Rizos D, Wade M, Boland MP, Evans ACO, Lonergan P. 2005. Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 64:1797–1808.

Ollero M, Cebrian-Perez Ja, Muino-Blanco T. 1997. Improvement of Cryopreserved Ram Sperm Heterogeneity and Viability by Addition of Seminal Plasma. *Journal of Andrology*, 18:732-739.

Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56:425-434.

Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, 25:224–233.

Platov EM. 1973. The theoretical and practical basis of freezing the semen of farm animals. Autoreferat of D. Bil. Sci. Thesis. All-Union Institute of Animal Breeding, Dubrovitz, pp.42.

Platov EM, 1983. An important factor affecting ewe fertility. *Ovtsevodstvo*, 6:35-37.

Profirov Y, Ivanov N, Popova P. 1986. Role of the plasma membrane in potassium, sodium and calcium content of ram spermatozoa after deep freezing. *Veterinary Medicine Nauki*, 23:73-77.

Robertson L, Watson PF, Plummer JM, 1988. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryoletter*, 9:286–293.

Salamon S, Lightfoot RJ. 1967. Freezing of ram spermatozoa by the pellet method. III. The effect of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 22:409–423.

Salamon S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62:77–111.

Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37:185–249.

Spungin B, Margalit I, Breitbart H. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science*, 108:2525-2535.

Strzezek J, Kostyra H, Zaborniak A. 1992. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. *Animal Reproduction Science*, 29:35–52.

Thérien I, Bleau G, Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, 52:1372-1379.

Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1998. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of Reproduction*, 59:768–776.

Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF. 1993. *Reproduction in Mammals and Man* (Ed.). Paris: Ellipses.

Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*, 89:159–170.

Troedsson MHT, Desvousges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89:171–186.

Tsekova E, Spasov KH, Angelova M, Georgiev GK. 1988. The effect of cryopreservation on the activity of acrosomal enzymes in ram spermatozoa. *Veterinary Medicine Nauki*, 23:73-76.

Vorobjev, NN, 1980. Phosphatase activity in semen (in Russian). *Ovtsevodstvo*, 1:37-38.

Watson PF, Green CE. 2000. Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common. *Boar Semen Preservation*, 4:53–60.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. *Animal Reproduction Science*, 60–61:481–492.