

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Plasma seminal suíno na criopreservação de sêmen ovino

Kauê Rodriguez Martins

Pelotas, 2014

Kauê Rodriguez Martins

Plasma seminal suíno na criopreservação de sêmen ovino

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Thomaz Lucia Jr.

Co-Orientação: Carine Dahl Corcini

Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M386p Martins, Kauê Rodriguez

Plasma seminal suíno na criopreservação de sêmen ovino / Kauê Rodriguez Martins. – 47f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Thomaz Lucia Jr. ; coorientador Arnaldo Diniz Vieira, Carine Dhal Corcini.

1.Biotecnologia. 2.Congelamento. 3.Plasma seminal. 4.Suíno. 5.Ovino. 6.Citometria. 7.Decapitação. I.Lucia Jr., Thomaz..II.Vieira, Arnaldo Diniz. III.Corcini, Carine Dhal. IV.Título.

CDD: 570.752

Banca examinadora:

Dr. Thomaz Lucia Junior (Orientador)

Dra. Fabiana Moreira

Dr. Rafael Gianella Mondadori

Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Agradecimentos

A meu orientador Thomaz Lucia Jr. por aceitar o desafio.

Aos professores do grupo Repropel: Bernardo, Carine, Rafael, Ivan, Thomaz, Fabiana (querida pos-doc) e Arnaldo pela orientação durante a realização do trabalho.

Ao professor Arnaldo Diniz Vieira em especial por todos os ensinamentos, lições de engenharia civil, mecânica, hídrica, marcenaria, serviços gerais e principalmente as orientações durante o mestrado.

Aos colegas de Pós-graduação Carlos, Karina, Elisa, Elisangela, Georgia, Gustavo, Zilah e Alexander pela amizade convívio e ensinamentos e as caronas!

Aos companheiros e colegas de laboratório especialmente Stela, Georgea, Andres (Dêêês), Mariah, Pedro, Monike, Matheus e Guilherme por me aguentarem durante o trabalho e os momentos divertidos vividos durante o experimento.

A Silvana do laboratório 7 do centro de biotecnologia pela ajuda com a quantificação de proteínas.

A Dr. Ligia, ao funcionário Giovani e a Embrapa clima temperado pela permissão do uso dos animais.

Ao biotério central da UFPel e todos seus funcionários durante o experimento com os camundongos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que ajudaram ou apoiaram para a realização deste trabalho.

Grato a todos!

Resumo

MARTINS, Kauê Rodriguez. **Plasma seminal suíno na criopreservação de sêmen ovino**. 2014. 47f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O interesse pelo uso da inseminação artificial (IA) em ovinos vem crescendo, em função do avanço no melhoramento genético. Entretanto, a criopreservação causa danos aos espermatozóides, diminuindo seu potencial fertilizante, quando a IA é feita com sêmen congelado, pela via cervical. Uma alternativa para proteger ou recuperar a célula dos danos da criopreservação é a adição de plasma seminal (PS), que contém vários fatores produzidos pelos testículos, epidídimos e glândulas acessórias do macho, com potencial de prevenir a capacitação prematura e danos gerados pelo congelamento. A adição de PS antes do congelamento seria benéfica para os processos de seleção e congelamento. A suplementação do diluente com PS ovino e suíno foi associada com aumento na motilidade espermática, após a segunda hora de incubação sob condições *in vitro*, assim como quando usado na refrigeração, congelamento e descongelamento. Este estudo teve como objetivo testar a adição de PS suíno (20%) ao diluente para congelamento do sêmen ovino e avaliar os parâmetros seminais *in vitro* pós-descongelamento. Ejaculados de quatro machos ovinos e três machos suínos foram coletados para formação de amostras combinando PS de vários machos (*pools*). Uma fração das amostras de PS foi destinada a quantificação de proteínas. Seis coletas dos quatro machos ovinos foram colhidas e diluídas em Tris-gema de ovo-glicerol, para congelamento, compondo três tratamentos: controle (sem PS); inclusão de 20% de PS ovino; e inclusão de 20% PS suíno. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas a um teste de termo resistência durante cinco horas. Avaliações de qualidade espermática foram realizadas a cada duas horas. Também foram realizadas análises por citometria de fluxo para as avaliações de integridade de acrossoma e integridade de membrana. Para os tratamentos controle, PS ovino e PS suíno, não foram observadas diferenças ($P > 0.05$) quanto a motilidade ($30,0 \pm 2,0$; $30,4 \pm 2,0$ e $24,6 \pm 2,0$ respectivamente), integridade de membrana ($37,5 \pm 2,6$; $40,9 \pm 2,6$ e $31,4 \pm 2,6$, respectivamente), função mitocondrial ($70,0 \pm 1,7$; $61,8 \pm 1,7$ e $63,6 \pm 1,7$, respectivamente) e integridade de DNA ($91,2 \pm 3,1$; $96,5 \pm 3,1$ e $93,6 \pm 3,1$, respectivamente). A integridade do acrossoma foi maior ($P < 0.05$) com inclusão de PS suíno ($59,3 \pm 3,5$) em comparação com o controle ($46,7 \pm 3,5$), mas ambas as médias foram similares ($P > 0.05$) à observada para o PS ovino ($56,7 \pm 3,5$). Conclui-se que apesar do benefício do PS suíno a 20% para a integridade de acrossoma, não se obteve resultados positivos nas demais avaliações de qualidade seminal.

Palavras-Chaves: Congelamento, plasma seminal, suíno, ovino, Citometria. decapitação.

Abstract

MARTINS, Kauê Rodriguez. **Swine seminal plasma for ram sperm cryopreservation.** 2014. 47p. Master's Dissertation – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

There is a growing interest in using artificial insemination (AI) in sheep due to the potential for genetic improvement. However, cryopreservation damages spermatozoa, decreasing their fertilizing potential when frozen semen is deposited in the cervix. Sperm damages attributed to cryopreservation may be minimized by the addition of seminal plasma (SP), which contains several factors produced by the testis, epididymis and accessory glands with potential to prevent premature capacitation. Supplementation of SP prior to freezing would be beneficial for various processes of periods of the selection and freezing process, reported before freezing would be beneficial for the processes of selection and freezing. The supplementation of extenders with SP from ram and boars is associated with increased sperm motility after incubation *in vitro*, as well as when used for cooling, freezing and thawing. The objectives of this study were to test the addition of 20% boar SP to the extender to freeze ram sperm and to evaluate parameters of sperm quality after thawing. Ejaculates from four rams and three boars were collected to form pooled SP samples. A fraction of each pooled sample was used for protein quantification. Six samples from four rams were collected and diluted in Tris-egg yolk - glycerol for freezing, forming three treatments: control (no SP); inclusion of 20% ram SP; and inclusion of 20% boar SP. After thawing, the samples were subjected to a thermal stress test for five hours. Sperm quality was assessed every two hours. Analyses by flow cytometry were done to evaluate the integrity of acrosome and membrane integrity. For the control, ram SP and boar SP treatments, the evaluated parameters of sperm quality were: motility (30.4 ± 2.0 , 24.6 ± 2.0 and 30.0 ± 2.0 , respectively); membrane integrity (37.5 ± 2.6 ; 40.9 ± 2.6 and 31.4 ± 2.6 respectively); mitochondrial functionality (70.0 ± 1.7 ; 61.8 ± 1.7 and 63.6 ± 1.7); and DNA integrity (91.2 ± 3.1 ; 96.5 ± 3.1 and 93.6 ± 3.1 respectively). For those parameters, no significant differences were observed across treatments ($P > 0.05$). However, addition of boar SP to the extenders was related to greater acrosome integrity (59.3 ± 3.5) than that of the control (46.7 ± 3.5) ($P < 0.05$), although both means were similar ($P > 0.05$) to that observed for the treatment with ram SP (56.7 ± 3.5). Despite of the benefit on acrosome integrity related to addition of boar SP, no other positive effects were observed for post-thawing ram sperm viability.

Keywords: Freezing, seminal plasma, boar, ram, flow-cytometry, decapacitation.

Sumário

Banca examinadora	2
Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
1 Introdução Geral	7
1.1 Criopreservação do sêmen	7
1.2 O plasma seminal	8
1.3 Utilização do plasma seminal	9
Artigo	14
1 Introdução	15
2 Materiais e métodos	17
2.1 Obtenção e processamento do plasma seminal ovino	17
2.2 Obtenção e processamento do plasma seminal suíno	17
2.3 Determinação da concentração de proteína total nos <i>pools</i> de PS	18
2.4 Congelamento do sêmen ovino	19
2.3 Descongelamento do sêmen	19
2.4 Avaliações de qualidade seminal	20
2.5 Análise estatística	22
3 Resultados	22
4 Discussão	24
5 Conclusão	28
6 Referências	29
2 Conclusão geral	38
3 Referências gerais	40

1 Introdução geral

1.1 Criopreservação do sêmen

O interesse pelo uso da inseminação artificial (IA) em ovinos vem crescendo pelo fato de ser uma importante ferramenta para facilitar o melhoramento genético e o ganho nos sistemas de exploração. Esse ganho reprodutivo é muito mais expressivo quando se maximiza o aproveitamento de machos superiores mediante a criopreservação de seu sêmen.

A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados em nitrogênio líquido, com posterior retomada do desenvolvimento celular normal após o descongelamento (PEGG, 2007). Um dos efeitos mais significativos da criopreservação é a formação natural de cristais de gelo, a partir da água existente nos espaços intra e extracelulares. À medida que estes cristais vão se formando, eles assumem formas e tamanhos irregulares, podendo afetar as microestruturas de membranas e organelas, comprometendo a função celular (FAHY, 1987), sendo a membrana plasmática a primeira estrutura a ser afetada (BARRIOS *et al.*, 2000).

Ainda que o congelamento do sêmen contribua significativamente para a IA, o sêmen ovino possui uma sensibilidade inerente ao processo de criopreservação, o que resulta em baixos níveis de prenhez após IA cervical (SALAMON & MAXWELL, 2000). A sensibilidade ao processo de criopreservação resulta em perda de motilidade devido à baixa atividade mitocondrial (GILLIAN, 2004), menor sobrevivência dos espermatozoides no trato feminino (em parte devido às características anatômicas da cérvix da ovelha) e criocapacitação, por mudanças na membrana acrossomal durante o congelamento (GILLIAN *et al.*, 1997).

Outro problema existente na criopreservação é o dano causado pela diluição excessiva (MANN, 1964; LEHAY & DE GRAAF, 2012), realizada anteriormente ao congelamento, que resulta muitas vezes em redução na motilidade, na atividade metabólica e no potencial de fertilização (LEHAY & DE GRAAF, 2012). Uma alternativa para evitar o efeito da diluição, aumentando a qualidade seminal pós-descongelamento do sêmen ovino seria a adição de PS (MAXWELL & JOHNSON, 1999). O PS beneficia

a sobrevivência dos espermatozoides, aumentando sua resistência ao choque térmico e revertendo a criocapacitação (CROSS, 1993). Porém, existe certa relutância em utilizar o PS, o qual é considerado, de forma conservadora, somente como um veículo para os espermatozóides, ou até mesmo deletério para o armazenamento (RODRIGUEZ-MARTINEZ & BARTH, 2007).

1.2 O plasma seminal

O plasma seminal (PS) é composto por diversos fatores produzidos pelos testículos, epidídimos e glândulas acessórias, entre os quais podem ser citados: íons inorgânicos; açúcares; sais orgânicos; lipídeos; proteínas; enzimas; e prostaglandinas (BURROUGHS *et al.*, 2013; DRUART *et al.*, 2013). Sua composição complexa é necessária para manter a viabilidade espermática, inibindo a capacitação, protegendo a membrana celular e auxiliando o desencadeamento da motilidade espermática, durante o trânsito pelo trato reprodutivo do macho. No trato reprodutivo da fêmea, o PS interage com o epitélio e as secreções do útero e dos ovidutos modulando diversas reações, especialmente relacionadas ao sistema imune (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2011). Além disso, a composição do PS é altamente variável entre diferentes espécies e estações do ano (LEHAY *et al.*, 2010) e até mesmo entre machos (CABALLERO *et al.*, 2004), devido as diferenças na contribuição de cada glândula acessória (MANN, 1964; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2011).

Durante o acasalamento realizado em condições naturais, as proteínas do PS interagem com as moléculas da superfície dos espermatozoides, em uma tentativa de sincronizar a capacitação com a chegada destes até o oócito no momento da fertilização (BEDFORD, 2004). Portanto, os espermatozoides permanecem pouco tempo em contato com o PS, sendo capacitados rapidamente. Desta forma, os mecanismos de regulação da oxidação que levam os espermatozoides à rota da capacitação promovem um estresse celular, que lentamente os conduzirá a apoptose (AITKEN, 2011). Se a capacitação não ocorrer, os espermatozoides não estarão equipados para reconhecer o oócito quando atingirem o oviduto, e também não serão capazes de participar da intrincada cascata de interações célula-célula que culminará na fertilização (AITKEN & NIXON, 2013). A regulação da capacitação *in vivo* envolve a exposição dos espermatozoides a uma variedade de ligantes, os quais controlam o destino da célula, através de mecanismos mediados por receptores e a perda dos fatores de decapacitação da superfície espermática (AITKEN & NIXON, 2013).

Porém, quando são processados para criopreservação ou selecionados para sexagem, os espermatozoides podem ser expostos ao PS diluído por várias horas (BURROUGHS *et al.*, 2013), o que pode acarretar uma capacitação prévia. Nesses

casos, as proteínas específicas são removidas da superfície da célula espermática, concomitantemente com a reorganização lipídica e com a perda de colesterol da membrana plasmática, que ocorrem durante a capacitação (VADNAIS *et al.*, 2007). A perda destas proteínas, antes da fase de mudança lipídica da membrana espermática que ocorre durante a criopreservação, desencadearia o início do processo conhecido como criocapacitação (VADNAIS *et al.*, 2007).

1.3 Utilização do plasma seminal

Alguns estudos compararam a adição de PS, durante os vários períodos do processo de seleção e congelamento, relatando que a sua suplementação antes do congelamento seria benéfica para estes processos (PEREZ-PÉ *et al.*, 2001; MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008; LEHAY *et al.*, 2010). A suplementação do diluente com PS foi associado com aumento na motilidade espermática, após a segunda hora de incubação sob condições *in vitro* (ASHWORTH *et al.*, 1994), assim como quando usado na refrigeração, congelamento e descongelamento (GRAHAM *et al.*, 1994).

Para ovinos, Maxwell e Johnson (1999) verificaram que a adição de PS preveniu a ocorrência de aglutinações nas cabeças dos espermatozoides (provavelmente em função do início da fluidez da membrana plasmática), que seriam decorrentes da remoção de substâncias presentes na sua membrana plasmática. Esses fatores decapacitantes são polipeptídeos originados das secreções dos epidídimos e glândulas anexas, adsorvidos à membrana plasmática dos espermatozoides no momento da ejaculação (FRASER, 2008). Além disso, partículas da membrana plasmática de espermatozoides ovinos se agregam durante o resfriamento até 5°C (HOLT & NORTH, 1995) e proteínas intramembranas se redistribuem na membrana plasmática no espermatozoide de suínos e bovinos.

A adição de PS homólogo (de machos da mesma espécie) pode influenciar a capacidade fertilizante dos espermatozoides (KILLIAN *et al.*, 1993). Experimentos *in vitro* envolvendo a adição de PS de touros de baixa fertilidade ao sêmen de touros de alta fertilidade levaram à diminuição na taxa de penetração em oócitos (HENAULT & KILLIAN, 1996). Ainda, o uso de PS de bovinos domésticos melhora a habilidade de espermatozoides de búfalos africanos fertilizarem oócitos bovinos *in vitro*, o que indica que os efeitos do PS podem não estar restritos a um efeito autólogo (GERBER *et al.*, 2003).

Os espermatozoides ovinos aparentemente respondem bem à suplementação com PS homólogo. Este fato pode contribuir para a maior resistência dos espermatozoides ovinos a processos estressantes, como a seleção espermática e o armazenamento, em comparação com os espermatozoides de touros (DE GRAAF *et al.*, 2009).

Em suínos, sabe-se que a viabilidade pós-descongelamento pode ser melhorada quando adicionado PS ao diluente de congelamento (CABALLERO *et al.*, 2004), porém a presença de algumas proteínas pode variar dependendo da porção do ejaculado utilizada (CORCINI *et al.*, 2012)

Em equinos, a adição de PS de garanhões com alta motilidade pós-congelamento ao sêmen de garanhões com baixa motilidade melhorou a integridade de membrana e a motilidade progressiva (AURICH *et al.*, 1996). Em suínos, espermatozoides de diferentes machos diferem quanto a resposta ao PS autólogo e homólogo. Uma variação na presença, ausência ou concentração de alguns componentes, ou mais provavelmente sua ação combinada, pode ser responsável pela variabilidade no efeito sobre os espermatozoides (Caballero *et al.*, 2004).

Okazaki *et al.* (2009) utilizaram tratamento em duas etapas: inicialmente removendo o PS suíno da amostra logo após a coleta de sêmen; e posteriormente descongelando a amostra em uma solução contendo 10% de PS (v/v). Após a IA, a taxa de prenhez foi de 70%, comparável com a obtida com sêmen fresco. Em suínos, a adição de 10% e 20% de PS homólogo reduziu a proporção de espermatozoides capacitados, quando estes foram descongelados e incubados em um meio de suporte para capacitação (VADNAIS *et al.*, 2007). Quando foi utilizado um *pool* de PS suíno de 11 machos, na incubação de amostras pós-descongelamento nas concentrações de 10 e 50%, foi relatado um efeito dramático para a concentração de 50% na membrana plasmática, acompanhado de outras mudanças fisiológicas, o que não foi observado na concentração de 10% (FERNANDEZ-GAGO *et al.*, 2013). Entretanto, aparentemente, em uma pequena população de células espermáticas mais sensíveis, observou-se um aumento da fluidez de membrana nas amostras tratadas com 50% de PS, acompanhado de um aumento na produção intracelular de espécies reativas do oxigênio (ROS) e por um aumento na proporção de acrossomas danificados ou reagidos.

Ainda que o uso de PS tenha resultados contraditórios, um ponto em comum associado ao seu uso é a influência da estação do ano na qual este PS é coletado. Em ovinos, quando a coleta do PS é feita durante o outono e o inverno, observa-se melhora na motilidade total e progressiva dos espermatozoides após o descongelamento,

enquanto que o PS obtido na primavera e no verão, aparentemente não afeta a motilidade (BARRIOS *et al.*, 2000; DOMINGUEZ *et al.*, 2008). Portanto, o sêmen ovino descongelado pode ser suplementado com PS de outras espécies, minimizando o efeito do volume limitado e da variação sazonal da composição proteica dos ejaculados (PÉREZ-PÉ *et al.*, 2001; CARDOZO *et al.*, 2006).

Além do uso de PS autólogo e homólogo, também existe a possibilidade do uso de PS heterólogo, de ejaculados de machos de espécies diferentes, com base em semelhanças na composição entre os PS de espécies distintas, a partir de estudos utilizando espectrometria de massa e a análise *in silico* de proteínas (Druart *et al.*, 2013).

Ollero *et al.* (1997) dividiram o PS ovino e bovino em três frações: PS livre de proteínas; proteínas do PS livres de sais; e proteínas do PS termicamente desnaturadas. Com o uso de proteínas do PS ovino, houve um aumento de 60% na viabilidade de espermatozóides ovinos, mas não houve efeito das proteínas do PS bovino. Ainda, não houve recuperação da viabilidade espermática quando as proteínas do PS bovino foram adicionadas ao PS bovino livre de proteínas. Porém, quando o contrário foi testado, houve interação positiva, demonstrando que a adsorção de proteínas do PS é prevenida por um fator de baixo peso molecular presente no PS ovino.

Martins *et al.*, (2013) testaram a adição de PS equino, ovino e bovino ao sêmen ovino descongelado, relatando que o PS equino e o ovino afetam sua viabilidade em uma relação dependente de tempo, enquanto que o PS equino seria associado com estabilização da integridade do DNA espermático.

Considerando os dados acima descritos, estudos relacionando aos efeitos da adição de PS heterólogo ao sêmen ovino ainda são necessários. Este estudo possui como objetivo avaliar o efeito do PS suíno adicionado ao diluidor de congelamento de sêmen ovino.

Plasma seminal suíno na criopreservação de sêmen ovino
(Trabalho nas normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*)

Plasma seminal suíno na criopreservação de sêmen ovino.

KR Martins¹, SSM Gheller³, RG Mondadori², CD Corcini³, AD Vieira³, T Lucia Jr.³

¹ Unidade de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Av. Eliseu Maciel s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Instituto de Biologia, Departamento de Morfologia, Setor de Histologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, Avenida duque de Caxias 250, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Av. Eliseu Maciel s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

Conteúdo

O interesse pelo uso da inseminação artificial (IA) em ovinos vem crescendo, em função do avanço no melhoramento genético. Entretanto, a criopreservação causa danos aos espermatozoides, diminuindo seu potencial fertilizante, quando a IA é feita com sêmen congelado, pela via cervical. Uma alternativa para proteger ou recuperar a célula dos danos da criopreservação é a adição de plasma seminal (PS), que contém vários fatores produzidos pelos testículos, epidídimos e glândulas acessórias do macho, com potencial de prevenir a capacitação prematura e danos gerados pelo congelamento. A adição de PS antes do congelamento seria benéfica para os processos de seleção e congelamento. A suplementação do diluente com PS ovino e suíno foi associada com aumento na motilidade espermática, após a segunda hora de incubação sob condições *in vitro*, assim como quando usado na refrigeração, congelamento e descongelamento. Este estudo teve como objetivo testar a adição de PS suíno (20%) ao diluente para congelamento do sêmen ovino e avaliar os parâmetros seminais *in vitro* pós-descongelamento. Ejaculados de quatro machos ovinos e três machos suínos foram coletados para formação de amostras combinando PS de vários machos (*pools*). Uma fração das amostras de PS foi destinada a quantificação de proteínas. Seis coletas dos quatro machos ovinos foram colhidas e diluídas em Tris-gema de ovo-glicerol, para congelamento, compondo três tratamentos: controle (sem PS); inclusão de 20% de PS ovino; e inclusão de 20% PS suíno. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas a um teste de termo resistência durante cinco horas. Avaliações de qualidade espermática foram realizadas a cada duas horas. Também foram realizadas análises por citometria de fluxo para as avaliações de integridade de acrossoma e integridade de membrana. Para os tratamentos controle, PS ovino e PS suíno, não foram observadas diferenças ($P > 0.05$) quanto a motilidade ($30,0 \pm 2,0$; $30,4 \pm 2,0$ e $24,6 \pm 2,0$ respectivamente), integridade de membrana ($37,5 \pm 2,6$; $40,9 \pm 2,6$ e $31,4 \pm 2,6$, respectivamente), função mitocondrial ($70,0 \pm 1,7$; $61,8 \pm 1,7$ e $63,6 \pm 1,7$, respectivamente) e integridade de DNA ($91,2 \pm 3,1$; $96,5 \pm 3,1$ e $93,6 \pm 3,1$, respectivamente). A integridade do acrossoma foi maior ($P < 0.05$) com inclusão de PS suíno ($59,3 \pm 3,5$) em comparação com o controle ($46,7 \pm 3,5$), mas ambas as médias foram similares ($P > 0.05$) à observada para o PS ovino ($56,7 \pm 3,5$). Conclui-se que apesar do benefício do PS suíno a 20% para a integridade de acrossoma, não se obteve resultados positivos nas demais avaliações de qualidade seminal.

1. Introdução

O processo de resfriamento, congelamento e descongelamento dos espermatozoides induz injúrias em suas organelas, prejudicando sua funcionalidade (Watson, 1981). As primeiras injúrias ocorrem na membrana plasmática e acrossomal, em função de estresse térmico, mecânico, químico e osmótico (Maxwell & Watson, 1996; Prathalingam et al., 2006). Estas injúrias desencadeiam reações semelhantes ao processo de capacitação (Vadnais et al., 2005), limitando a vida fértil do espermatozoide descongelado (Martinez et al., 2005; Abad et al., 2007). Desta forma, é necessário buscar formas de proteger as membranas espermáticas para preservar o estado decapitado dos espermatozoides, para que estes possam se depositar nos reservatórios seminais da junção útero-tubárica do trato genital da fêmea, mantendo sua fertilidade (Fazeli et al., 1999; Tienthai et al., 2004).

Durante o trânsito no interior dos testículos e o processo ejacutório, os espermatozoides entram em contato com uma gama de fatores moduladores, secretados pelos epidídimos e pelas glândulas acessórias, o qual compõe o plasma seminal (PS), que serve de veículo e de substrato nutritivo, além de manter o estado decapitado dos espermatozoides (Maxwell et al., 2007). Essa condição de estabilidade da membrana característica do estado não capacitado é promovida por proteínas de baixo peso molecular, classificadas como família BSP, inicialmente identificadas no PS bovino. Dentre as BSP, foram identificadas as espermadesinas (glicoproteínas com peso molecular de 12-16 kDa), que são proteínas multifuncionais que exibem uma vasta gama de habilidades ligantes a fosfolipídios de heparina, inibidores de protease e carboidratos que mudam com o estado de adesão e glicosilação. Dependendo de sua capacidade ligante, as espermadesinas que se ligam a superfície espermática podem ser classificadas em ligantes de heparina e não ligantes de heparina (Jonakova et al., 2000; Topfer-Petersen et al., 1998). A variedade de propriedades

ligantes sugere que as espermedesinas atuam em diversos eventos durante a vida dos espermatozoides, incluindo a capacitação, a formação do reservatório espermático no oviduto, a interação de gametas e a imunomodulação uterina (Caballero et al., 2008). Por estarem presentes no PS, a suplementação do diluente com PS homólogo no descongelamento demonstrou capacidade de reverter lesões provocadas pelo choque térmico em espermatozoides ovinos (Barrios et al., 2000; 2005; Cardozo et al., 2008), estando associado com elevação nas taxas de prenhez em equinos (Alghamdi et al., 2004), ovinos (Maxwell et al., 1999) e suínos (Rozeboom et al., 2000). Porém, o uso de PS homólogo apresenta restrições sanitárias e também é limitado pelo seu baixo volume por ejaculado, como no caso dos pequenos ruminantes, indicando o uso de PS heterólogo como alternativa. Nesse sentido, PS bovino (Ollero et al., 2007; Matavéia et al., 2010; Martins et al., 2013), equino (Martins et al., 2013) e canino (Matavéia et al., 2010) foram usados como aditivos protetores dos espermatozoides ovinos descongelados. Entretanto, até o momento não existem relatos do uso de PS suíno como aditivo protetor do espermatozoide ovino, apesar de haver certa homologia (em torno de 22%) entre as proteínas do PS das duas espécies (Druart et al., 2013). Como existe efeito positivo da adição de PS homólogo ao diluente de sêmen suíno congelado, faz-se necessário testar a viabilidade do uso do PS suíno como aditivo ao diluente de congelamento de sêmen ovino. O objetivo deste estudo é testar a adição de PS suíno ao diluente previamente ao congelamento do sêmen ovino a fim de avaliar os parâmetros seminais *in vitro* pós-descongelamento.

2. Materiais e métodos

Exceto onde especificado, todos os produtos utilizados foram obtidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

2.1 Obtenção e processamento do plasma seminal ovino

Quatro carneiros da raça Criolula lanada com idade em torno de 72 meses foram usados como doadores de sêmen e PS ovino. Os machos permaneceram alojados nas instalações da Embrapa Clima Temperados (Latitude 31° 42' S, Longitude 52° 24' O; Altitude 57m), em pastagem nativa e recebendo alimentação concentrada duas vezes ao dia e água *ad libidum*. Ejaculados foram colhidos no período de julho a setembro pelo método da vagina artificial, durante nove semanas. Os ejaculados foram encaminhados para o laboratório em uma caixa térmica a 37°C, para a determinação da motilidade espermática. Somente foram processados os ejaculados com motilidade $\geq 70\%$ e vigor $\geq$ a três (escala de 1-5). Os ejaculados foram submetidos a duas seções de centrifugação a 12.500 x g por 10 min, em centrífuga refrigerada (4°C). A partir de cada amostra foram coletadas alíquotas de 400 µL de PS, que foram mantidas congeladas a -20°C. Após acumular nove rotinas de coleta, totalizando 36 amostras, procedeu-se o descongelamento das alíquotas e a constituição de um *pool*, que foi fracionado e mantido congelado a -20°C até o momento do uso.

2.2 Obtenção e processamento do plasma seminal suíno

O PS suíno foi obtido de três machos suínos híbridos, com idade em torno de 16 meses de idade. Os machos permaneceram alojados no setor de suínos da Faculdade de veterinária da Universidade Federal de Pelotas (Latitude 31° 80', Longitude 52° 41', Altitude 57m) recebendo alimentação concentrada duas vezes ao dia e água *ad libidum*. Concomitantemente às duas

últimas semanas do período de coleta do PS ovino, foram coletadas e separadas todas as frações dos ejaculados dos machos suínos, com exclusão da parte gelatinosa pelo uso de filtro no copo coletor, pelo método da mão enluvada (Hancock & Hovel, 1959; Bearden & Fuquay, 1997), sendo somente utilizada a fração rica para a obtenção do plasma seminal. A partir da fração rica a motilidade e o vigor espermático foram determinados imediatamente após a coleta, sendo utilizados apenas os ejaculados com motilidade e vigor nos mesmos níveis descritos anteriormente para os ejaculados de ovinos. De cada ejaculado, 15 alíquotas de 1,0 mL foram submetidas a duas seções de centrifugação sob refrigeração (4°C). Inicialmente procedeu-se uma centrifugação a 2.500 x g por 5 min e, após um período de repouso isotérmico de 60 min, procedeu-se uma segunda centrifugação a 10.000 x g por 10 min. O PS obtido na primeira semana foi armazenado a -20°C, sendo descongelado e associado ao PS obtido na segunda semana, para constituir o *pool* de PSS que foi fracionado e mantido congelado a -20°C até o momento do uso.

2.3 Determinação da concentração de proteína total nos *pools* de PS

A determinação da concentração total de proteínas em cada *pool* de PS foi realizada pelo método de espectrofotometria (Bradford, 1976). Inicialmente, foi gerada uma curva analítica de calibração do equipamento (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA) com soluções de BSA diluída em reagente de Bradford. A partir das médias obtidas em leituras em triplicata de absorbância (595 nm), foi gerada uma equação linear de absorbância versus concentração ($R^2 = 0,9761$). Após a calibração do equipamento, foram realizadas avaliações em triplicatas das amostras dos *pools* de PS ovino e suíno diluídos em água ultra-pura na proporção de 1:100, para determinação da concentração total de proteínas em cada *pool* de PS.

2.4 Congelamento do sêmen ovino

Imediatamente após as coletas ($n = 6$), foram obtidas amostras para determinação da concentração espermática, enquanto que o restante do ejaculado foi diluído na proporção 1:1 com Tris-gema-glicerol (Evans & Maxwell, 1987). A partir de uma concentração protéica ajustada (o PS ovino foi diluído 1:4 em solução fisiológica), foram constituídos três tratamentos de congelamento de sêmen ovino: sem adição de PS (controle); com adição de 20% de PS ovino; e com adição de 20% de PS suíno. Antes do congelamento, foram avaliados: motilidade e vigor (microscopia óptica); integridade da membrana; integridade do acrossoma e integridade do DNA (por microscopia de epifluorescência). Após a determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer, procedeu-se a diluição final do sêmen em volume suficiente para obter uma concentração de 50×10^6 células por palheta de 0,25 mL. Após o envase, as palhetas de todos os tratamentos foram mantidas em caixa condicionadora (Igloo® Kool Mate 12 volt 40 Quart Cooler, S. King Company Inc., Kenosha, Wisconsin, USA), para resfriamento a $0,3-0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ até 5°C . Após estabilização por 90 min a 5°C , as palhetas foram resfriadas a -79°C em vapor de Nitrogênio por 10 min, antes de serem submersas no Nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas até o momento do descongelamento.

2.5 Descongelamento do sêmen

Em cada rotina de congelamento, uma palheta de cada tratamento foi descongelada em banho-maria a 37°C durante 30 seg (Maxwell et al., 1999). Após a homogeneização do conteúdo da palheta em um microtubo cônico (1,5 ml), foram realizadas as avaliações, com diluição em 1,5 mL de solução de 2,94% de citrato de sódio, em condições isotérmicas, para

realização de um teste de termo resistência a 37°C durante 5 h (Bag et al., 2004). Realizou-se a análise de motilidade e vigor da hora 0 até a hora 5. Às 0, 2 e 4 h, foram avaliadas a integridade da membrana, do acrossoma e do DNA e a funcionalidade mitocondrial. Para as avaliações da integridade da membrana e do acrossoma por citometria de fluxo, amostras de 5 µl de sêmen descongelado foram adicionadas a um tubo com 300 µl de PBS adicionado das sondas fluorescentes (FITC-PNA, iodeto de propídeo e Hoestch).

2.5.1 Avaliações de qualidade seminal

A avaliação da motilidade e do vigor espermático foi realizada sempre pelo mesmo técnico, em um microscópio equipado com mesa térmica a 37°C (HT 50, Minitub, GE). As amostras foram colocadas entre lâmina e lamínula e visualizadas sob um aumento de 200 X.

A integridade da membrana espermática foi avaliada através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), em microscópio de epifluorescência (Nikon 80i, Tokio, JP), sob aumento de 400 x, com filtro WU com excitações de 450-490nm e emissão de 516nm (CFDA) e 617nm (IP). Em cada lâmina foram contadas 200 células espermáticas para avaliação do acúmulo dos fluorocromos. As células que emitiam fluorescência verde foram classificadas como possuindo membrana íntegra e aquelas que emitiam fluorescência vermelha foram classificadas como lesadas (Harrison & Vickers, 1990). Para a avaliação da integridade do acrossoma foi seguida a metodologia utilizada por Kawamoto, (1999). A integridade do DNA foi avaliada a partir do protocolo modificado descrito por Evenson et al. (1999), usando a sonda acridine Orange, diferenciando entre as bicatêniárias e monocatêniárias. Foram adicionados 5 µL de sêmen a 10 µL de solução de 0,01M Tris-HCl + 1 mM NaCl + 1 mM EDTA 2 H₂O. Em seguida, foi adicionada 50 µL de

1 triton (1:100 v/v) e 10 µL de Acridine Orange (diluído 1g em 1000 ml de H₂O MiliQ). Após 5
2 min, a amostra foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula para a leitura. As lâminas
3 foram avaliadas com aumento de 1000 x, em microscópio de epifluorescência (Nikon 80i,
4 Tokio, JP), através de excitações de 450-490 nm e emissão 520 nm.

5 A funcionalidade da mitocôndria foi avaliada baseada na técnica descrita por Evenson,
6 (2002) com a sonda Rodamina 123 (Rh123). Uma alíquota de 20 µL do sêmen foi adicionada
7 a uma solução contendo formaldeído, IP, Rh123 e citrato de sódio, incubada a 37°C por 5 min,
8 em sala escura. A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Nikon 80i, Tokio,
9 JP), sob aumento de 400 x, em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516–
10 617 nm.

11 Para a citometria, as avaliações da integridade da membrana e do acrossoma por esta
12 técnica utilizaram o método descrito por Martínez-Pastor et al. (2010). Foi utilizado o
13 citômetro de fluxo Attune® (Life Technologies™, Aplyed Biosystems™). As sondas FITC-
14 PNA e IP foram excitadas pelo laser azul (488nm) e capturada nos filtros 530;30 (BL-1) e
15 640LP (BL-3), respectivamente. Foi usado o laser violeta de 405 nm para H 33342 (Hoestch,
16 Sigma B2261), 450/40 (VL-1) com a função de separar a população de células dos debris e
17 sujidades da amostra. Estes debris podem ser descartados utilizando *gates* em pontos
18 específicos de um gráfico de pontos combinado a FSC (*forward scatter of the laser light*)/VL-
19 1 na emissão de fluorescência dos espermatozóides. A partir de um *gate* contendo apenas
20 espermatozoides, as populações de células com acrossoma íntegros/reagidos e com membrana
21 íntegra foram geradas. Antes da leitura, procedeu-se a incubação das amostras por 15 min a
22 temperatura ambiente, com os fluorocromos protegidos da luz. A velocidade de análise foi de
23 25 µl/min avaliando um total de 10.000 eventos. Os dados obtidos foram gerados em um

gráfico logarítmico pelo programa Attune® Cytometric Software, version 1.2.5 (Life Technologies™ Applied Biosystems™).

2.6 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. Porém, como nenhuma das respostas de interesse apresentou distribuição normal, os dados foram submetidos à transformação arco-seno. As respostas foram comparadas em função dos tratamentos e dos períodos de incubação após o descongelamento através de análise de variância com medidas repetidas, com o efeito dos machos doadores de sêmen agrupado ao efeito da coleta de sêmen. As comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tuckey. Ainda, os resultados das avaliações de integridade da membrana e integridade do acrossoma, realizadas por microscopia às 0 h e por citometria de fluxo foram associados através do teste de correlação de Pearson. Todas as análises foram conduzidas com Statistix® (2008).

3. Resultados

A concentração total de proteínas indicou que o PS ovino é aproximadamente quatro vezes mais concentrado que o PS suíno (188 µg/ml x 48 µg/ml, respectivamente). Foram observadas respostas das análises de motilidade, integridade de membrana, integridade de acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e integridade de DNA frente aos três tratamentos durante a hora 0 (Tabela 1).

A motilidade e integridade de membrana do PS suíno foi a menor entre os 3 tratamentos ($P < 0,05$), enquanto que o PS ovino foi semelhante ao tratamento controle ($P < 0,05$). A integridade de membrana foi melhor no ovino que no suíno, porém não diferiu do controle ($P < 0,05$), entretanto para a análise de função mitocondrial o controle apresentou maiores médias em relação ao PS ovino e suíno que não diferiram entre si. A integridade de DNA não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$).

O período de incubação do sêmen após o descongelamento afetou os parâmetros de qualidade seminal de forma distinta (Tabela 2). A motilidade, integridade de membrana e integridade de acrossoma não apresentaram diferença significativa até duas horas de incubação, porém houve diferença na hora quatro ($P < 0,05$). A função mitocondrial apresentou diferença desde a hora 0 até a hora 4 ($P < 0,05$). A avaliação de integridade de DNA não diferiu significativamente em função do tempo de incubação ($P > 0,05$).

Uma interação entre os efeitos dos tratamentos e dos períodos de incubação do sêmen foi detectada para a integridade da membrana e funcionalidade de mitocôndria (Tabela 3). No tratamento com PS suíno, a integridade da membrana após 4 h de incubação foi semelhante à observada com 0 h ($P > 0,05$), enquanto que nos demais tratamentos houve queda na integridade da membrana ($P < 0,05$). Ainda, a função mitocondrial para os três tratamentos foi semelhante durante a hora 0, porém após duas horas de incubação houve um declínio acentuado nas médias para os três tratamentos, sendo mais evidente no PS suíno ($P < 0,05$). Após quatro horas o PS ovino apresentou maiores médias, porém foi semelhante aos demais tratamentos.

As avaliações da integridade da membrana espermática e do acrossoma através de citometria de fluxo não detectaram diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Quando comparadas com as avaliações das mesmas variáveis, realizadas por microscopia de fluorescência às 0 h de incubação, foi observada uma correlação positiva tanto para a integridade da membrana ($R = 0,7915$), quanto para a integridade do acrossoma ($R = 0,9148$) ($P < 0,01$, para as ambas as variáveis).

4. Discussão

Este estudo comparou o efeito da adição de 20% de PS ovino e suíno pré-congelamento ao sêmen ovino diluído em tris-gema 1:1 (v/v). Até então, não havia relatos de experimentos utilizando o PS suíno como aditivo para diluente de sêmen ovino. A adição do PS ovino foi associada com aumento na integridade de membrana e acrossoma pós-descongelamento do sêmen ovino criopreservado, enquanto que a adição de PS suíno demonstrou benefício somente para a integridade de acrossoma. Comparando tratamento e tempo, a integridade da membrana com PS ovino apresentou maiores taxas para as horas 0, 2 e 4, resultados que se assemelham com outro estudo utilizando o PS ovino (Barrios et al., 2000). No entanto, o PS suíno apresentou maiores taxas de integridade da membrana a partir de duas h de incubação.

Quanto à funcionalidade da mitocôndria, os tratamentos com PS ovino e suíno foram inferiores ao controle, podendo-se notar um aumento na atividade a partir de duas horas de incubação para ambos os tratamentos e um declínio da duas até as quatro horas, no tratamento com PS ovino. A ausência de alterações na motilidade e na integridade da membrana, do acrossoma e do DNA, entre zero e duas horas de incubação representa uma informação relevante para trabalhos em condições de campo, indicando que mesmo após duas horas de

1 incubação após o descongelamento, o sêmen ovino não apresentou redução relevante em
2 vários parâmetros de qualidade.

3 A correlação positiva ($R < 0,01$) observada entre as avaliações de integridade da
4 membrana e do acrossoma por microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo indicam
5 que, apesar da discrepância, os resultados obtidos com ambos os métodos são compatíveis. No
6 entanto, as avaliações por citometria de fluxo não comprovaram os efeitos aparentemente
7 positivos e negativos da inclusão de PS, em especial o PS suíno, observados na análise por
8 microscopia. Ainda, os percentuais de espermatozoides com membrana íntegra, obtidos
9 através da citometria de fluxo, foram aparentemente mais baixos do que os obtidos com
10 microscopia, porém para a integridade do acrossoma, os percentuais mais elevados foram
11 obtidos com o uso de citometria de fluxo, o que pode indicar que, apesar da finalidade da
12 técnica ser a mesmo, as técnicas apresentam certa variação entre si devido ao método de
13 preparo e de contagem da amostra.

14 Os dados obtidos com o PS ovino corroboram estudos anteriores, que demonstram a
15 eficiência da adição do PS ovino com o intuito de recuperar, diminuir ou frear o efeito do
16 congelamento em células criopreservadas (Barrios et al., 2000; Colas et al., 2009). Apesar de a
17 composição do PS suíno incluir mais de 90% de espermadesinas (Romero et al., 1997; Topfer-
18 Petersen et al., 1998), que apresentam efeitos na capacitação, somente obteve-se resultado
19 positivo quanto a integridade de acrossoma, provavelmente devido a presença de proteínas
20 homólogas. Estas proteínas, identificada no PS ovino no estudo de Barrios et al., (2005) e
21 Cardozo et al., (2008), tendo sua presença confirmada a presença no PS suíno no estudo de
22 Druart et al., (2013). Apesar da homologia de 22% entre as proteínas dos plasmas seminais
23 utilizados no estudo, conforme descrito por Druart et al. (2013), o plasma seminal suíno
24 parece não ser adequado para se assemelhar ao efeito do PS ovino. Porém, ainda não se

1 conhecem todas as propriedades apresentadas pelas proteínas do PS, nem sua interação com
2 espermatozoides de outras espécies. Portanto, ainda é necessário identificar e purificar
3 proteínas que beneficiem o congelamento para serem posteriormente adicionadas a diluentes e
4 crioprotetores ou durante o momento de incubação.

5 Experimentos que relatam o uso de PS são contraditórios, pois a resposta dos
6 espermatozoides ao PS pode ser altamente variável, em parte devido à presença de fatores
7 inibitórios e estimuladores (Lehay et al., 2010; Muiño-Blanco et al., 2008). Porém, um ponto
8 em comum abordado é a estação do ano na qual o PS é coletado (Perez-Pé et al., 2001; Leahy
9 et al., 2010). Estes resultados controversos são provavelmente a consequência dos
10 componentes e da concentração de PS utilizado, devido este ser uma mistura complexa de
11 proteínas que apresentam efeitos positivos e negativos nos parâmetros seminais (Rovegno et
12 al., 2013).

13 Fernandez-Gago et al. (2013) relataram um aumento da fluidez da membrana de
14 espermatozoides suínos, em amostras tratadas com 50% de PS suíno, seguido por um aumento
15 na produção intracelular de ROS e na proporção de acrossomas danificados ou reagidos, efeito
16 que não pode ser detectado quando os espermatozoides eram tratados com 10% de PS. O que
17 indica que deve-se buscar uma concentração ideal para cada espécie.

18 O PS ovino obtido durante o outono e inverno seria associado com melhoria na
19 motilidade total e progressiva dos espermatozoides após o descongelamento, enquanto que o
20 PS obtido na primavera e no verão não teria efeito sobre a motilidade (Barrios et al., 2000;
21 Dominguez et al., 2008; Sharma et al., 2014). Neste experimento, o PS de ambas as espécies
22 foi obtido no período de inverno, enquanto que as coletas de sêmen para o congelamento
23 foram realizadas na primavera. Sabe-se também que existe uma grande variação na
24 composição do PS entre diferentes espécies, entre diferentes machos, e até mesmo, entre cada

1 ejaculado colhido dos mesmos machos (Ashworth et al., 1994; Killian et al., 1993; Zhu et al.,
2 2000). Porém, no presente estudo o uso de *pools* combinando PS de vários machos pode ter
3 eliminado parcialmente o efeito individual de cada macho.

4 Alguns estudos afirmam que a composição do PS de cada macho pode ser a alternativa
5 para alguns problemas de fertilidade, a partir da identificação de proteínas que aperfeiçoam
6 certas características (Caballerro et al., 2004; Colas et al., 2009). Assim, cada macho pode ser
7 destinado a um tipo diferente de atividade (congelamento, FIV, entre outros), pois as
8 diferenças na fertilidade observadas entre os animais, muitas vezes não são detectadas pelos
9 testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen. Esses métodos de avaliação
10 tem sido objeto de importantes progressos nos últimos anos, embora nenhum teste de
11 laboratório seja comprovadamente eficaz na predição da fertilidade (Amman, 1995). Análises
12 bioquímicas, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na
13 identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais. Uma das
14 alternativas futuras a serem seguidas neste sentido, poderia ser a metodologia semelhante a de
15 Kukov et al., (2009), que separou várias proteínas do PS através de cromatografia e utilizou
16 diferentes frações do PS na incubação pós-descongelamento, demonstrando diferentes efeitos
17 na motilidade e na viabilidade dos espermatozoides, dependendo da fração utilizada. Neste
18 estudo realizado por Kuvov et al.,(2009), observou-se que proteínas de baixo peso molecular
19 (14-20 kDa) são absorvidas especificamente na superfície da membrana plasmática na região
20 apical e na parte intermediária da cabeça, podendo apresentar um maior efeito protetor do que
21 proteínas com maior peso molecular.

22

23

24

5. Conclusão

A adição de 20% de PS ovino ao diluente para congelamento do sêmen ovino demonstrou efeitos positivos nos parâmetros seminais pós-congelamento de integridade de membrana e integridade de acrossoma. A adição de 20% de PS suíno também beneficiou a integridade de acrossoma, porém não apresentou efeitos sobre os parâmetros de qualidade seminal.

Acknowledgments

Os autores agradecem a Lígia Margareth Cantarelli Pergoraro e a Embrapa clima temperado pela autorização do uso dos machos ovinos e instalações. Também a Silvana Marchioro pela ajuda na quantificação de proteínas.

Fontes de financiamento

Os autores agradecem a agencia de Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Conflito de interesses

Os autores não têm conflito de interesses a declarar.

Contribuição dos autores

O estudo foi conduzido pelo autor K.R Martins como parte da obtenção do título de mestre em biotecnologia sob a orientação de T. Jr. Lucia, C.D. Corcini, R.G. Mondadori e A.D. Vieira. SSM Gheller participou da coleta de amostras e avaliações *in vitro*.

Referências bibliográficas

- Alcaide M, Serrano, MC, Pagani, R, Sánchez-Salcedo S, Vallet-Regí M, Portolé smt, 2009: Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials*, **30**, 45–51.
- Abad M, Sprecher DJ, Ross P, Friendshop RM, Kirkwood RN, 2007: Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reproduction in Domestic Animals*, **42**, 149-152.
- Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson, MHT, 2004: Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*, **127**, 593-600.
- Attune® Cytometric software version 1.2.5©. Life Technologies Corporation. Van Allen Way, Carlsbad, CA, 92008, USA. 2011.
- Bag S, Joshi A, Mittal J F, 2004: Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology*, **62**, 415-24.
- Bearden HJ, Fuquay JW. Semen collection, in: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Ed.), *Applied Animal Reproduction*, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 147-157, 1997.
- Bedford J.M., 2004: Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **79**, 429–460.

- 1 Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino- Blanco T, Cebrian-Perez JÁ:
2 2000: Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane.
3 *Biology of Reproduction*, **63**, 1531–1537.
- 4 Barrios B, Fernandez-Juan M, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez, JA, 2005:
5 Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma
6 proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, **26**, 539–549.
- 7 Bradford MM, 1976: A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
8 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*,
9 **72**, 248-254.
- 10 Caballero I, Vazquez JM, Centurió F, Rodríguez-Martinez H, Parilla I, Roca J, Cuello C,
11 Martinez EA, 2004: Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on
12 the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, **39**,
13 370- 375.
- 14 Cardozo JA, Fernández-Juan M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, 2008: Identification of
15 RSVP14 and RSVP20 components by two-dimensional electrophoresis and western-blotting.
16 *Reproduction in Domestic Animals*, **43**, 15–21.
- 17 Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, 2008: Cyclic-AMP
18 initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm
19 capacitation. *Reproduction and Fertility*, **20**, 649–658.
- 20 Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z,
21 Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, De Graaf SP, 2013: Proteomic
22 characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma, *Journal of*
23 *Proteomics*, **91**, 13-22.

- 1 Evans G, Maxwell WMC, **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sidney:
2 Butterworths, 1987. 194 p.
- 3 Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, Angelis P, Claussen OP,
4 1999: Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the
5 human fertility clinic. **Human reproduction**, **14**, 1039-1049.
- 6 Evenson DP, Larson K L, Jost LK, 2002: Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for
7 detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.
8 **Journal of Andrology**, **23**, 25-43.
- 9 Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt, WV, 1999: Sperm-oviduct interaction: induction of
10 capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells
11 in porcine species. **Biology of Reproduction**, **60**, 879-886.
- 12 Fernández-Gago R, Domínguez JC, Martínez-Pastor F, 2013: Seminal plasma applied post-
13 thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, **80**, 400–
14 410.
- 15 Henault MA, Killian GJ, 1996: Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the
16 fertilizingability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine
17 oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, **108**, 199–204.
- 18 Jonakova V, Manaskova P, Kraus M, Liberda J, Ticha M, 2000: Sperm surface proteins in
19 mammalian fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, **56**, 275–277.
- 20 Jones RC, Martin ICA, 1973: The effects of dilution, egg yolk and cooling to 58C on the
21 ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, **35**, 311–320.
- 22 Jones RC, Holt WV, 1974: The effects of washing on the ultrastructure and cytochemistry of
23 ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, **41**, 159–167.

- 1 Kawamoto A, Kazutomo O, Kishikawa H, Zhu L, Azuma C, Murata Y, 1999: Two-color
2 fluorescent staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertility and*
3 *Sterility*, **71**, 497-501.
- 4 Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA, 1993: Fertility associated proteins in Holstein bull
5 seminal plasma. *Biology of Reproduction*, **9**, 1202–1207.
- 6 Kukov A, Daskalova D, Ivanova-Kicheva M, Stefanov R, Neicheva A, 2009:
7 Immunocytochemical localization of separated seminal plasma proteins on the ram's sperm
8 plasma membrane during in vitro preservation at 4°C. *Biotechnology in Animal Husbandry*,
9 **25**, 925-934.
- 10 Lehay T, Marti J I, Evans G, Maxwell WMC, 2010: Seasonal variation in the protective effect
11 of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **119**,
12 147–153.
- 13 Martins LT, Santos Neto PC, Gaudêncio Neto S, Vieira FK, Ribeiro ES, Mezzalira A, Vieira
14 AD, 2013: Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm.
15 *Animal Reproduction*, **10**, 697-703.
- 16 Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Vazquez J L, 2005: An
17 update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production.
18 *Reproduction in Domestic Animals*, **40**, 300–309.
- 19 Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez MA, Álvarez M, Anel L, De Paz
20 P, 2010: Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in*
21 *Domestic Animals*, **45**, 67–78.
- 22 Matavéia GA, Terblanche SJ, Nöthling JO, Gerber D, 2010: Effect of heterologous seminal
23 plasma and semen extenders on motility of frozen–thawed ram spermatozoa. *Journal of the*
24 *South African Veterinary Association*, **81**, 139–142.

- 1 Maxwell WMC, Watson PF, 1996: Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal*
- 2 *Reproduction Science*, **42**, 55–65.
- 3 Maxwell WMC, Jhonson LA, 1999: Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the
- 4 influence of seminal Plasma. *Theriogenology*, **52**, 1353-1362.
- 5 Maxwell WMC, Evans G, Mortime, ST, Gillian L, Gellatly ES, Mcphie CA, 1999: Normal
- 6 fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented
- 7 with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Devevelopment*, **11**, 123–126.
- 8 Maxwell W M C, De Graaf S P, El-Hajj G R, Evans G, 2007: Seminal plasma effects on
- 9 sperm handling and female fertility. *Society for Reproduction and Fertility*, **64**, 13–38.
- 10 Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrian-Pérez JA, 2008: Seminal plasma proteins and sperm
- 11 resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**, 18 -31.
- 12 Ollero M, García-Lopez N, Pérez-Pé R, Cebrian-Pérez JA, Muiño-Blanco T, 1997:. Surface
- 13 changes of RAM spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma
- 14 proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reproduction, Fertility and*
- 15 *Development*, **9**, 381-390.
- 16 Pérez-Pé R, Barrios B, Muiño-Blanco T, Cebrian-Pérez JA, 2001: Seasonal differences in ram
- 17 seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Journal of*
- 18 *Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications*, **760**, 113–121.
- 19 Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF, 2006: Impact of
- 20 antifreeze proteins and antifreeze glycoproteinson bovine sperm during freeze-thaw.
- 21 *Theriogenology*, **66**, 1894–1900.
- 22 Romero A, Romao MJ, Varela PF, Kolln I, Dias JM, Carvalho AL, Sanz L, Töpfer-Petersen
- 23 E, Calvete JJ,1997: The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold.
- 24 *Nature Structural Biology*, **4**, 783–788.

- 1 Rovegno M, Feitosa WB, Rocha AM, Mendes CM, Visintin, JA, Assumpção, MEOD, 2013:
2 Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. Cell
3 Tissue Bank, **14**, 333–339.
- 4 Rozeboom KJ, Troedsson MH, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG, 2000: The importance of
5 seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. Journal of
6 Animal Science, **78**, 443-448.
- 7 Statistix®. Statistix 9 analytical software. Tallahassee, Florida, USA. 2008.
- 8 Sharma, L, Pandey V, Nigam R, Singh P, Saxena A, Swain DK, 2014: Seasonal Variations in
9 Seminal Plasma Proteins of Buffalo, 2014: Reproduction in Domestic Animals, 1-5.
- 10 Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2004: Sperm capacitation in the porcine
11 oviduct. Animal Reproduction Science, **80**, 131-146.
- 12 Topfer-Petersen E, Romero A, Varela, PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L,
13 Calvete JJ, 1998: Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives.
14 Andrologia, **30**, 217–224.
- 15 Vadnais ML, Kirkwood RN, Specher DJ, Chou KA, 2005: Effects of extender, incubation
16 temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm
17 as determined by chlortetracycline staining. Animal Reproduction Science, **90**, 347–354.
- 18 Watson PF. **The effects of cold shock on sperm cell membranes.** In: Morris, G.J., Clarke, A.
19 (Ed.), Effects of low temperatures on biological membranes, Academic Press, London (1981),
20 pp. 189–218.
- 21 Zhu J, Xu X, Cosgrove JR, Foxcroft GR, 2000: Effect of semen plasma from different
22 fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. Theriogenology, **54**, 1443–1452.
- 23

Endereço do Autor (para correspondência): Unidade de Biotecnologia, Centro de
Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Av.
Eliseu Maciel s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:
kauerodriguez@gmail.com

1 Tabela 1: Qualidade do sêmen ovino pós-descongelamento em função da inclusão de plasma seminal (PS) de
 2 diferentes espécies na hora 0

Variável (%)	Tratamento		
	Controle	PS ovino	PS suíno
Motilidade	30,0 ± 2,0 ^{ab}	30,4 ± 2,0 ^a	24,6 ± 2,0 ^b
Integridade da membrana	37,5 ± 2,6 ^{ab}	40,9 ± 2,6 ^a	31,4 ± 2,6 ^b
Integridade do acrossoma	46,7 ± 3,5 ^b	56,7 ± 3,5 ^a	59,5 ± 3,5 ^a
Função mitocondrial	70,0 ± 1,7 ^a	61,8 ± 1,7 ^b	63,6 ± 1,7 ^b
Integridade do DNA	91,2 ± 3,1 ^a	96,5 ± 3,1 ^a	93,6 ± 3,1 ^a

3 ^{a,b}Médias ± EPM com expoentes distintos demonstram diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 Tabela 2: Qualidade do sêmen ovino em função do tempo de incubação após o descongelamento

Variável (%)	Tempo de Incubação (h)		
	0	2	4
Motilidade	28,3 ± 1,0 ^A	25,7 ± 1,0 ^A	16,7 ± 1,0 ^B
Integridade da membrana	36,6 ± 1,5 ^A	35,0 ± 1,5 ^A	24,5 ± 1,5 ^B
Integridade do acrossoma	54,3 ± 2,3 ^A	49,5 ± 2,3 ^A	42,8 ± 2,3 ^B
Função mitocondrial	65,1 ± 1,7 ^A	45,1 ± 1,7 ^B	35,4 ± 1,7 ^C
Integridade do DNA	93,8 ± 1,8 ^A	96,0 ± 1,8 ^A	95,0 ± 1,8 ^A

2 ^{a,b,c}Médias ± EPM com expoentes distintos demonstram diferença significativa em função do tempo (P<0,05).

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Tabela 3: Integridade da membrana e função mitocondrial em função da inclusão de plasma seminal (PS) de diferentes espécies e do tempo de incubação do sêmen ovino após o descongelamento

Variável (%)	Tempo (h)	Tratamento		
		Controle	PS ovino	PS suíno
Integridade da membrana	0	37,5 ± 2,6 ^{ab}	41,0 ± 2,6 ^a	31,4 ± 2,6 ^{bc}
	2	30,9 ± 2,6 ^{bcd}	38,2 ± 2,6 ^{ab}	36,0 ± 2,6 ^{ab}
	4	22,1 ± 2,6 ^d	26,2 ± 2,6 ^{cd}	25,3 ± 2,6 ^{cd}
Função mitocondrial	0	70,0 ± 3,0 ^x	61,8 ± 3,0 ^x	63,6 ± 3,0 ^x
	2	48,1 ± 3,0 ^y	48,3 ± 3,0 ^y	38,9 ± 3,0 ^{xy}
	4	35,2 ± 3,0 ^z	38,3 ± 3,0 ^{yz}	32,7 ± 3,0 ^z

^{a,b,c} Médias ± EPM com expoentes distintos demonstram diferença significativa em função da interação tratamentos e tempo (P<0,05).

^{x,y,z} Médias ± EPM com expoentes distintos demonstram diferença significativa em função da interação tratamentos e tempo (P<0,05).

Tabela 4: Integridade da membrana e do acrossoma após o descongelamento para sêmen ovino, em função da inclusão de plasma seminal (PS) de diferentes espécies, após avaliação por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

Variável (%)	Método	Controle	PS ovino	PS suíno
Integridade da membrana	Microscopia	37,5 ± 2,6	41,0 ± 6	31,4 ± 2,6
	Citometria	22,4 ± 4,0	17,3 ± 4,0	14,0 ± 4,0
Integridade do acrossoma	Microscopia	46,7 ± 4,1	56,7 ± 4,1	59,5 ± 4,1
	Citometria	69,4 ± 3,4	63,3 ± 3,4	62,6 ± 3,4

Para a análise de citometria não houve significância estatística ($P > 0,05$).

Correlação positiva entre microscopia e fluorescência e citometria para integridade de mitocôndria ($R < 0,7915$) e integridade de acrossoma ($R < 0,9148$).

2 Conclusão Geral

A adição do PS ao sêmen pode ser uma alternativa para evitar os danos causados pelo resfriamento, efeito da diluição, aumentar parâmetros de capacitação, motilidade, reversão do choque térmico. Neste estudo foi observado um efeito benéfico da adição do PS ovino e suíno em alguns parâmetros de fertilidade. Conclui-se que, apesar da semelhança de 22% das proteínas entre os PS suíno e ovino, a adição de 20% de PS suíno ao diluente do sêmen criopreservado ovino afetou positivamente o parâmetro de integridade de acrossoma, porém os demais parâmetros seminais de fertilidade não foram afetados positivamente no pós-descongelamento. Mais análises são necessárias para definir o uso do plasma heterólogo, identificando principalmente proteínas que possam interagir com os espermatozoides ovinos, sem diminuir seu potencial fertilizante. Alternativas para a continuidade deste estudo são:

- Uso de novos fluorocromos para análises de integridade de membrana, apoptose, funcionalidade de mitocôndria, peroxidação lipídica e fluidez de membrana;
- Uso do teste de penetração oocitária e fertilização *in vitro*, para avaliar a fertilidade do sêmen pós-descongelamento;
- Análise da ultra-estrutura da célula espermática, submetida ao congelamento e descongelamento, através do uso da microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
- Uso da eletroforese 2D para a diferenciação de proteínas de cada macho;
- Uso de espectrometria de massa para a identificação das proteínas obtidas na eletroforese 2D;
- Após a diferenciação e identificação das proteínas de cada macho, buscar semelhanças em bancos de dados *in silico* por proteínas alvo;
- Purificação e teste das proteínas mais significantes obtidas após a análise *in silico*;

- Testar a adição destas proteínas separadamente no sêmen pré-congelamento e pós-congelamento utilizando métodos de imunomarcação para confirmar sua ação.

3 Referências Gerais

AITKEN, R.J. The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 9–12, 2011.

AITKEN, R.J.; NIXON, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 12, p. 785-793, 2013.

AURICH, J.G.; KU'HNE, A.; HOPPE, E.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791–798, 1996.

ASHWORTH, P. J. HARRISON, R.A.; MILLER, N.G.; PLUMMER, J.M; WATSON, P.F. Survival of ram spermatozoa at high dilution; protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 173-180, 1994.

BARRIOS, B., PÉREZ-PÉ, R., GALLEGU, M., TATO, A., OSADA, J., MUINO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531–7, 2000.

BEDFORD JM, 2004: Enigmas of mammalian gamete form and function. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 79, p. 429–460, 2004.

BURROUGHS, C.A.; GRAHAM, J.K.; LENZ, R.W.; SEIDEL, G.E.J. Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. **Theriogenology**, v. 79, p. 551–557, 2013.

CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., CENTURIÓ, F., RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.,PARILLA, I., ROCA, J., CUELLO, C., MARTINEZ, E.A. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals** v. 39, p. 370 – 375, 2004.

- CARDOZO, J. A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, p. 841-850, 2006.
- CORCINI, C.D.; VARELA JR., A.S.; PIGOZZO, R.; RAMBO, G.; GOULARTE, K.L.; CALDERAM, K.; LEON, P.M.M.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA, T. JR. Pre-freezing and post thawing quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein bands present in seminal plasma. **Livestock Science**, v.145, p.28–33, 2012.
- CROSS, N. L. Multiple effects of seminal plasma on the acrossome reaction of human sperm. **Molecular Reproduction Development**, v. 35, p. 316-323, 1993.
- DE GRAAF S.P.; BEILBY, K.H.; UNDERWOOD, S.L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. **Theriogenology**, v. 71, p. 89-97, 2009.
- DOMÍNGUEZ, M.P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E., CESARI, A.; ALBERIO, R.H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v. 69, p. 564–573, 2008.
- DRUART, X.; RICKARD, J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; KERSHAW-YOUNG, C.M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; B. CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C.G.; DE GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma, **Journal of Proteomics**, v. 91, p. 13-22, 2013.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. **Cryo Letters** v. 4, p. 309-314, 1983.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v. 80, p. 400–410, 2013.

FRASER, L. R. The role of small molecules in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 70, p. 1356-1359, 2008.

GERBER, D.; DE HAAS, K.; NÖTHLING, J.O. Effect of bovine seminal plasma on the ability of buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa to fertilize bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, p.11-15, 2003.

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.

GRAHAM, J. K. Effects of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 412, p. 1151-1169, 1994.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, p. 473-483, 1984.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizingability of ejaculated bull spermatozoa assessed by

penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 199–204, 1996.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 9, p. 1202–1207, 1993.

LEHAY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 147–153, 2010.

LEAHY, T.; DE GRAAF, S.P. seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p.207–213, 2012.

MARTINS, L.T.; SANTOS NETO, P.C.; GAUDÊNCIO NETO, S.; VIEIRA, F.K.; RIBEIRO, E.S.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction**, v. 10, p.697-703, 2013.

MAXWELL, W.M.C.; JHONSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal Plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

MANN T, 1964: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen and Co Ltd, London.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 18 –31, 2008.

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

OLLERO, M.; GARCÍA-LOPEZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 381-390, 1997.

PEGG D. E. 2007. Cryopreservation and freeze-drying protocols methods. In: **Molecular Biology**. 2nd Ed. Totowa: Humana Press Inc., 348 p.

PÉREZ-PÉ, R., BARRIOS, B., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIAN-PÉREZ, J.A., Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 760, p. 113–121, 2001.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, J.; CALVETE. J.J Seminal plasma proteins: what roles do they play?. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 11-22, 2011.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BARTH, A.D. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.6, p.39-54, 2007.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p .77-111, 2000.

VADNAIS, M. L.; ROBERTS, K. P. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 416-422, 2007.