



## Efeito de proteínas do plasma seminal eqüino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen

Marcus Antonio Pessanha Barreto<sup>1</sup>, José Frederico Straggiotti Silva<sup>1</sup>, Bruno Fagundes<sup>1</sup>, José Renato Costa Caiado<sup>1</sup>, Guilherme Valente de Souza<sup>1</sup>, Aldo Shimoya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Campos dos Goytacazes - RJ.

<sup>2</sup> Universidade Salgado de Oliveira, Campos dos Goytacazes - RJ.

**RESUMO** - Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de concentrados de proteínas do plasma seminal (PPS) no diluente de congelamento sobre a congelabilidade do sêmen eqüino. Foram avaliados três tratamentos: um controle, no qual o sêmen foi congelado no diluente Botu-Crio®; e outros dois, com adição de 10% ou 20% (v/v) de proteínas do plasma seminal ao diluente. As maiores médias de motilidades total e progressiva foram observadas no tratamento controle, que foram superiores às obtidas com adição de 20% de proteínas, mas não diferiram das obtidas com adição de 10% de PPS. Os resultados do teste hiposmótico e do número de espermatozóides vivos obtidos com o congelamento do sêmen no diluente (controle) foram superiores aos encontrados com a adição de 10% de PPS, que, por sua vez, foram melhores que os observados com a adição de 20% de PPS ao diluente. A adição do concentrado de proteínas do plasma seminal não melhora os parâmetros espermáticos do sêmen eqüino.

Palavras-chave: criopreservação, eqüino, plasma seminal, sêmen

## Effect of high concentration of protein of the equine seminal plasma on semen cryopreservation

**ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate the effect of increasing the concentration of protein of the seminal plasma in the extender used for freezing equine semen. Three treatments were compared: The conventional one, defined by using only the Botu-Crio® extender for freezing semen; and other two defined by adding 10% (v/v) or 20% (v/v) of seminal plasma proteins to Botu-Crio® extender. Averages of total and progressive motility were statistically higher in the conventional treatment than in that defined by adding 20% (v/v) of seminal plasma proteins but they did not differ from those obtained by adding 10% (v/v) of seminal plasma proteins to Botu-Crio® extender. The best results for the hypoosmotic test and the number of live spermatozoa were obtained in the conventional treatment, and results for adding 10% (v/v) of seminal plasma proteins were better than those obtained by adding 20% (v/v) of seminal plasma proteins to Botu-Crio® extender. These results indicate that the addition of concentrated protein of the seminal plasma to the extender did not improve the cryopreservation of equine semen.

Key Words: cryopreservation, equine, semen, seminal plasma

### Introdução

A criopreservação aumenta a disponibilidade de espermatozóides, facilitando os trabalhos de reprodução assistida. Entre as vantagens da criopreservação, destacam-se a otimização do uso de ganhos com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo.

Pesquisas têm confirmado que o plasma seminal tem efeito modulatório na resposta inflamatória pós-cobertura

e que a proteção conferida aos espermatozóides pelo plasma seminal pode ser benéfica, principalmente no caso de segunda cobertura ou inseminação durante o mesmo cio, quando os espermatozóides encontram ambiente uterino hostil, decorrente da resposta inflamatória desencadeada pela cobertura ou inseminação subsequente (Troedson et al., 2002; Rozeboom et al., 2000).

Grande parte do plasma seminal é retirada durante a preparação do sêmen para o processo de criopreservação (Aurich et al., 1998), o que talvez explique a resposta inflamatória mais acentuada quando se utiliza sêmen criopreservado (Troedson et al., 2002).

A centrifugação do sêmen antes do seu congelamento é um procedimento padrão usado para concentrar o sêmen e remover o plasma seminal e seus possíveis efeitos nocivos. Entretanto, devem ser consideradas diferenças entre garanhões quanto à composição e qualidade do plasma seminal, pois em alguns o efeito pode ser benéfico e em outros o efeito do plasma seminal pode ser prejudicial ao congelamento (Aurich et al., 1998).

A adição de plasma seminal com boa congelabilidade ao sêmen com baixa motilidade espermática após congelamento-descongelamento aumentou significativamente a motilidade progressiva em estudo realizado por Aurich et al. (1996). Verificou-se maior integridade de membrana e, além disso, a adição de plasma seminal de baixa congelabilidade diminuiu a motilidade progressiva do sêmen com boa motilidade pós-congelamento. Os componentes do plasma seminal que determinam a boa congelabilidade do sêmen ainda são desconhecidos e as diferenças individuais no conteúdo destas substâncias estabilizadoras no plasma seminal podem explicar as diferenças na capacidade de congelamento entre garanhões (Aurich et al., 1996).

Troedsson et al. (2002) demonstraram que o plasma seminal reduz significativamente a ligação entre espermatozoides e polimorfonucleados quando espermatozoides são incubados (*in vitro*) em secreções de útero inflamado. Alghamdi et al. (2001) relataram que polimorfonucleados encontrados em secreções uterinas afetam negativamente a motilidade de células espermáticas e atribuíram esse efeito negativo à ligação entre polimorfonucleados e espermatozoides, que forma agregados celulares.

Fagundes (2003) observou que a adição de proteínas do plasma seminal autólogo, com massa molecular superior a 10 kDa ao diluente de congelamento melhora as características espermáticas pós-descongelamento, enquanto as proteínas com massa inferior a 10 kDa afetam negativamente a viabilidade espermática.

O plasma seminal possui proteínas com várias funções nos espermatozoides, entre elas, o remodelamento da superfície espermática, o estabelecimento de reservas de espermatozoides no oviduto, a modulação da capacitação, a interação entre gametas (Töpfer-Petersen et al., 2005), a modulação da resposta inflamatória e a proteção dos espermatozoides no útero (Troedson et al., 2002), entretanto, quase todo o plasma seminal é descartado durante o congelamento de sêmen. Neste trabalho, avaliaram-se os efeitos da adição de um concentrado de proteínas seminais com massa superior a 10 kDa sobre a congelabilidade do sêmen equino.

## Material e Métodos

Foram utilizados cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador com 4 a 12 anos de idade, no Haras Lugavi, localizado em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, no período de outubro de 2006 a janeiro de 2007.

Os garanhões tiveram suas reservas epididimárias esgotadas por meio de coleta diária durante sete dias. O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial modelo Botucatu, com temperatura de  $42 \pm 1^\circ\text{C}$ . A vagina artificial foi equipada com copo e filtro modelo Colorado, com o objetivo de separar a porção gelatinosa do sêmen. As coletas foram realizadas utilizando-se égua em cio como manequir para estimular o garanhão a realizar a monta.

Os plasmas seminais dos garanhões foram coletados no mesmo momento. Em seguida, os ejaculados foram identificados e centrifugados a  $1500 \times g$  durante 15 minutos e o sobrenadante foi aspirado e acondicionado em um becker de 250 mL (30 mL de cada garanhão), quando foram adicionados 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma®), 1 mM de benzamidina (Sigma) e 5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) no volume final de plasma seminal, com objetivo de inibir a ação de proteases. O plasma seminal foi refrigerado e transportado até o laboratório, onde foi centrifugado, por duas vezes, durante 40 minutos a  $40.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  no rotor P70 AT da centrífuga HIMAC CP 75b da HITACHI para retirar impurezas ou células espermáticas.

O plasma seminal foi concentrado dez vezes utilizando-se o concentrador protéico e acondicionado (150 mL) no concentrador para o processo de filtração, que foi mantido até a obtenção de 135 mL do material filtrado. Após a filtração, obtiveram-se no interior do concentrador 15 mL de plasma seminal com proteínas de massa molecular superior a 10 kDa concentradas dez vezes. Utilizou-se a membrana filtrante AMICOM 10000, que retém proteínas com massa molecular superior a 10 kDa e pressão de aproximadamente três bar de nitrogênio. Durante todo o processo, as amostras foram mantidas em gelo. Após o tratamento, o material retido pela membrana foi armazenado em alíquotas de 1,5 mL e mantido a  $-70^\circ\text{C}$  até o momento de sua utilização, quando foi adicionado ao diluente de congelamento.

Foram congelados três ejaculados de cada garanhão, em intervalo de dois dias entre cada coleta de sêmen, utilizando-se somente amostras com motilidade superior a 70%. O sêmen foi diluído em diluente à base de leite, segundo Souza et al. (2001), na proporção de uma parte de sêmen para duas de diluente. A concentração espermática foi determinada com auxílio de uma câmara de Newbauer.

Após a diluição e determinação da concentração de espermatozoides, o sêmen foi dividido em três tubos cônicos devidamente identificados (um tubo por tratamento) e centrifugado a 600 xg por 10 minutos. Os espermatozoides foram ressuspensos com diluente de congelamento de cada tratamento para obtenção de uma concentração de 100 milhões de espermatozoides por mililitro. No tratamento convencional, o sobrenadante foi aspirado, deixando-se 6% (aproximadamente 2% de plasma seminal), e ressuspendido com diluente de congelamento (Botu-Crio<sup>®</sup>); no tratamento com 10% de PSS, o sobrenadante foi totalmente aspirado e o diluente de congelamento foi adicionado com 10% de plasma seminal com proteínas de massa molecular acima de 10 kDa concentradas dez vezes; no tratamento com 20% de PSS, o sobrenadante foi totalmente aspirado e o diluente de congelamento foi adicionado com 20% de plasma seminal com proteínas de massa molecular acima de 10 kDa concentradas dez vezes.

Após a ressuspensão, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, devidamente identificadas. As palhetas foram vedadas com álcool polivinílico e, então, foram mantidas em repouso por 20 minutos a  $4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as palhetas foram colocadas no vapor de nitrogênio líquido (4 cm acima do nível) por 10 minutos e posteriormente, foram imersas no nitrogênio e armazenadas no botijão criobiológico.

Foram descongeladas três palhetas de cada partida de sêmen por ganhão e por tratamento, totalizando nove palhetas de cada ganhão. O descongelamento foi realizado em água a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e as análises de motilidade total e progressiva, por meio de análise computadorizada pelo programa Hamilton Thorne Research (Version 10.8 HTM-CEROS). Para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides, foi realizado o teste do choque hiposmótico, segundo Dell'Aqua Júnior (2000).

Para avaliação da integridade acrossomal e da viabilidade espermática, foram utilizadas as sondas Fitc-PNA (FITC labeled; L 7381, Sigma<sup>®</sup>) e iodeto de propídio (Sigma<sup>®</sup>), de acordo com a técnica descrita por Kirk (2001), modificada por Landim-Alvarenga, citado por Cunha (2002), por meio de microscópio de epifluorescência (Zeiss, Janamed 2, Alemanha) com aumento de 1000X utilizando-se óleo de imersão. Para a visualização da fluorescência, foram utilizados os filtros de fluoresceína (azul) e rodamina (verde) para a observação dos corantes Fitc-PNA e iodeto de propídio, respectivamente. Primeiramente, foi realizada a contagem das células espermáticas em campo claro e, imediatamente depois, o mesmo campo foi visualizado sob epifluorescência, registrando-se todas as células que emitiam qualquer fluorescência. A contagem foi finalizada somente quando

o número de células em campo claro alcançava 200 células. A classificação das células foi realizada segundo Cunha (2002): reação acrossomal verdadeira = visualização apenas da emissão da fluorescência verde (Fitc-PNA); falsa reação do acrossomo = visualização da emissão da fluorescência verde na região acrossomal (Fitc-PNA) e vermelha (PI); espermatozoides lesados = visualização apenas da emissão da fluorescência vermelha (PI); espermatozoides integros = células não coradas.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas pelo programa computacional Genes (Cruz, 2001)

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, teste hiposmótico e ( $P < 0,05$ ) para número de espermatozoides vivos diferiram ( $P < 0,01$ ) entre os tratamentos, o que indica a existência de variabilidade. Com exceção dos espermatozoides com falsa reação de acrossoma (PNA<sub>v</sub>), os coeficientes de variação mostraram boa precisão ( $CV = 7,90$  a  $17,18$ ).

O tratamento convencional apresentou maior ( $P < 0,05$ ) média de motilidade progressiva e total em comparação àquele com 20% de PSS, porém, não diferiu daquele com 10% de PSS (Tabela 1).

Estes resultados diferem dos achados de Fagundes (2003), que observou melhores resultados de motilidade total e também de motilidade progressiva quando utilizou proteínas de plasma seminal concentradas segundo metodologia utilizada neste experimento. Entretanto, no experimento realizado por Fagundes (2003), o plasma seminal utilizado foi proveniente do mesmo ganhão (plasma autólogo). Existe a possibilidade de que algum tipo de interação ocorre quando o plasma de diferentes ganhões é misturado, o que concorre para a diminuição da motilidade. Outra diferença foi o tipo de diluente, uma vez que Fagundes (2003) utilizou o diluente proposto por Martin (1979), cujo crioprotetor é o glicerol, e obteve motilidade média 17,65% menor que a observada neste estudo (42,87) com o diluente comercial Botu-Crio<sup>®</sup>, que contém amidas como crioprotetor. Alvarenga et al. (1996) relataram que o sêmen de ganhões da raça Mangalarga Marchador apresentou baixa resistência ao congelamento. Gomes et al. (2002) utilizaram o glicerol como crioprotetor no diluente de congelamento e observaram que o sêmen de apenas dois ganhões apresentou motilidade superior a 30%, enquanto, ao utilizarem amidas como crioprotetor, a motilidade aumentou para 44,06%.

Tabela 1 - Motilidade total (MOTT), motilidade progressiva (MOTP), espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HO), espermatozóides mortos (PNAvm), falsa reação de acrossoma (PNAvv) e espermatozóides íntegros (PNAnc)

	MOTT	MOTP	HO	PNAvm	PNAvv	PNAnc
Convencional	42,87a	33,66a	39,29a	41,44a	13,80a	49,71a
10% de PPS	33,60ab	25,51ab	33,50b	45,22a	11,45a	43,24b
20% de PPS	28,36b	21,58b	25,26c	44,82a	8,78a	41,42b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Alvarenga et al. (2005) relataram que as amidas promovem crioproteção maior, em comparação ao glicerol, em espermatozóides eqüinos. Os benefícios do diluente Botu-Crio, que utiliza amidas como crioprotetor, podem ter melhorado a motilidade dos espermatozóides dos ganhões, o que inibiu os possíveis efeitos benéficos das proteínas do plasma seminal relatados por Fagundes (2003). Não houve neste experimento seleção prévia de ganhões quanto à resistência de suas células espermáticas ao processo de congelamento, o que pode explicar a diminuição da motilidade espermática quando as proteínas do plasma seminal foram adicionadas ao diluente de congelamento. Também foi observado efeito dose-dependente na diminuição da motilidade, pois, quando a porcentagem de proteínas seminais aumentou de 10 para 20%, houve diminuição mais acentuada na motilidade, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) do tratamento convencional.

Aurich et al. (1996) observaram que o plasma seminal proveniente de ganhões cujo sêmen suporta melhor o processo de criopreservação melhorou significativamente a motilidade progressiva no sêmen de baixa congelabilidade. Esta observação sugere a necessidade de se considerar a qualidade do plasma seminal, pois, dependendo da composição e qualidade, o plasma seminal pode beneficiar ou prejudicar a congelabilidade do sêmen. Segundo Fagundes (2003), a adição de proteínas do plasma seminal autólogo com massa molecular superior a 10 kDa concentradas dez vezes, na proporção de 10% (v/v) ao diluente de congelamento favoreceu a motilidade dos espermatozóides. Entretanto, para realizar esse procedimento, é necessário proceder à coleta de sêmen do ganhão, centrifugar a amostra e descartar os espermatozóides, pois o processo de concentração do plasma seminal é demorado e inviabiliza o aproveitamento dos espermatozóides desta coleta. Somente os espermatozóides provenientes de uma segunda coleta do mesmo ganhão poderiam ser aproveitados para criopreservação. O congelamento comercial de sêmen só se justifica quando animais de alto valor genético são utilizados como doadores de sêmen. Quando um ganhão apresenta estas características, normalmente existe grande demanda pelo seu sêmen, de modo que, na metodologia proposta por

Fagundes (2003), seria necessário despende a metade dos ejaculados destes ganhões apenas para concentrar proteínas. Visando otimizar a utilização destes ganhões de alto valor, propôs-se neste trabalho a utilização de um *pool* de plasma seminal proveniente de cinco ganhões, pois, assim, ganhões de baixo valor genético poderiam servir como doadores de plasma seminal, o que melhoraria a utilização dos ganhões de alto valor. No entanto, os resultados não foram os esperados, pois o diluidor pode ter inibido os efeitos do plasma e não foram feitos testes prévios com estes ganhões para saber se eram os melhores doadores de plasma.

O tratamento convencional foi superior aos demais no teste hiposmótico e na contagem de espermatozóides vivos, enquanto aquele com 10% de PPS foi superior ao de 20% de PPS. A adição do concentrado de proteínas do plasma seminal não melhorou os parâmetros espermáticos avaliados neste trabalho.

A avaliação da integridade de acrossoma realizada através das sondas Fitc-PNA e iodeto de propídio mostrou não haver diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos com relação ao número de espermatozóides com falsa reação de acrossoma, entretanto o número de espermatozóides vivos foi superior no tratamento convencional.

## Conclusões

A adição de proteínas do plasma seminal concentradas dez vezes ao diluente de congelamento prejudica os parâmetros espermáticos.

## Literatura Citada

- ALGHAMDI, A.; TROEDSSON, M.H.T.; LASCHKEWITSCH, T. et al. **Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. Theriogenology**, v.55, n.4, p.1019-1028, 2001.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JR., J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. **Proceedings...** Amersfoort, 1996. p.82 [abstract].
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H. et al. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1998.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: versão windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 648p.
- CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do semen de case**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2002. 149p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, 2002.
- DELL' AQUA JR. **Efeito de centrifugação, tipos de envase e temperatura de congelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2000. 81p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 2000.
- FAGUNDES, B. **Análise do congelamento e descongelamento de sêmen equino utilizando proteínas do plasma seminal em diferentes concentrações**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. 47p.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, p.47, 1979.
- ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.H.T.; HODSON, H.H. et al. The importance of seminal plasma on spermatozoa viability of subsequent artificial inseminations in swine. **Journal of Animal Science**, v.78, p.443-448, 2000.
- SOUZA, G.V.; MATTA, M.F.R.; MATTA, C.G.F. et al. Comparação de antibióticos pró-análise e comerciais adicionados ao diluente seminal glicina-gema na motilidade de espermatozoides de ganhões conservados a 5°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.2, n.3, p.450-451, 2001.
- TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.-A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v.58, p.225-228, 2002.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.
- TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v.58, p.453-456, 2002.