



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE  
RUMINANTES**

**USO DA *Binder of Sperm Protein 1* (BSP1) BOVINO NA  
CONGELABILIDADE DE SÊMEN DE GARANHÃO**

**ANDREZA RODRIGUES VIANA**

**GARANHUNS- PE**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE  
RUMINANTES**

**USO DA *Binder of Sperm Protein 1* (BSP1) BOVINO NA  
CONGELABILIDADE DE SÊMEN DE GARANHÃO**

**ANDREZA RODRIGUES VIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

**Orientador:** Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

**GARANHUNS - PE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

V614u Viana, Andreza Rodrigues  
Uso da *Binder of Sperm Protein 1* (BSP1) bovino na  
congelabilidade de sêmen de garanhão / Andreza  
Rodrigues Viana. – 2019.  
80 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.

Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de  
Ruminantes)-Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós – Graduação em Sanidade e Reprodução  
de Ruminantes, Garanhuns, BR - PE, 2019.

Inclui referências.

1. Ruminante 2. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc.  
3. Touro 4. Sêmen I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient.  
II. Título

CDD 636.2

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E  
REPRODUÇÃO DE RUMINATES**

**USO DA *Binder of Sperm Protein 1* (BSP1) BOVINO NA  
CONGELABILIDADE DE SÊMEN DE GARANHÃO**

Dissertação elaborada por

**ANDREZA RODRIGUES VIANA**

Aprovada no dia 27 de fevereiro de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

**PRESIDENTE/ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO FERRER  
CARNEIRO  
DMV– UFRPE**

---

**PROF. DR. VICTOR NETTO MAIA  
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE**

---

**PROF. DR. LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO  
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE**

**GARANHUNS – PE**

**2019**

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, que foram meu porto seguro perante as dificuldades durante este percurso.

Aquele que te guarda, não dorme (Salmo 121.3).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não seria nada;

A minha mãe Maria José Rodrigues, que sempre esteve comigo me apoiando, foi meu primeiro e melhor colo e ainda continua sendo, a ela devo minha vida;

Ao meu pai Lourival Pereira, que é o homem da minha vida, exemplo de amor, carinho, compaixão, honestidade. Ele que acreditou em mim em todos os momentos, apostou na minha capacidade, sempre me incentivou em todas as minhas decisões, a ele devo meu sucesso;

Ao meu irmão André Viana, que é um verdadeiro anjo em minha vida, sempre muito atencioso e amoroso comigo, és um segundo pai pra mim;

A minha avó que é a melhor avó do mundo, quem me deu os melhores ensinamentos de vida;

Ao meu querido orientador e amigo Prof. Dr. Gustavo Ferrer, pela paciência, contribuição, compreensão, oportunidades, e principalmente por todo incentivo para que eu persistisse e não desistisse do meu sonho, que contribuiu em grande parte em todo meu sucesso, e agradeço em especial por sua amizade;

Ao meu amigo Dr. Oswaldo Gomes, por todos os ensinamentos, conselhos, contribuição profissional, oportunidade, e em especial por seu acolhimento de braços abertos juntamente com sua equipe do Haras Monte Verde, obrigada por tudo;

A minha querida amiga Gilvannya, por toda ajuda durante o experimento e acolhimento em sua casa, um anjo que Deus colocou em minha vida, serei eternamente grata por tudo que fez por mim e por sua amizade, que Deus te abençoe;

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo, Almir, Talita, Débora, Rayani, aos quais o destino me ligou, obrigada por todos os momentos que passamos juntos, eu AMO vocês;

As minhas queridas amigas da UFC, Arabela, Denize, Moêmia e em especial Kamila (kamis), por toda ajuda e acolhimento durante o período que passei em Fortaleza;

Ao Professor Arlindo Moura, pela oportunidade que me deu ao abrir as portas de seu laboratório na UFC;

A todos os amigos do ANDROLAB, André Mariano, Flávio Mergulhão, Robespierre Araújo, por toda ajuda e paciência.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista anterior da vesícula seminal.....	18
Figura 2 - Esquematização do processo de centrifugação de partículas com diferentes tamanhos e forças centrífugas.....	26
Figura 3 - Esquema da separação de moléculas por diálise.....	27
Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino criopreservado no tempo 0h, nos diferentes tratamentos com fração enriquecida com BSP1.....	78
Tabela 2 - Cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino criopreservado no TTR 1h, nos diferentes tratamentos com fração enriquecida com BSP1.....	79
Tabela 3 - Os resultados das análises pós-descongelamento referentes a integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentagem

< - Menor

Mg - Micrograma

µm - Micrômetro

µm/s - Micrômetro por segundo

µl - Microlitro

ANDROLAB - Laboratório de Andrologia

ANOVA - Análise de variância

aSFP - Proteína ácida do fluído seminal bovino

ALH - Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

BCF - Frequência de batimentos

BSP - Binder of Sperm Proteins

°C - Celsius

CASA - Computer Assited Sperm Analysis- Sistema Automático de Análise de Motilidade

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CRISPs - Proteínas ricas em cisteína

DCF - Diacetato de carboxfluoresceína

DCF - Diacetato de carboxfluoresceína

DMSO - Dimetilsulfóxido

FITC-PNA - Isotiocionato de fluoresceína conjugado a *Penaut agglutinin*

EQ12 - Proteína equina expressa no corpo e na cauda do epidídimo

EROs - Espécies reativas ao oxigênio

FITC-PNA - Peanut agglutin

Fn-2 - Proteínas com número variável de domínios de fibronectina do tipo II

g - Grama

g/L - Grama por litro

HSP1- Horse seminal protein 1

HSP2 - Horse seminal protein 1

Hz - Hertz

iAC - Integridade de acrossoma

iMP - Integridade de membrana plasmática  
IP - Iodeto de propídeo  
JC-1 - Fluorocromo catiônico lipofílico  
KDa - kilodalton  
LABRAPE - Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
LIN - Linearidade  
mL - Micrograma  
MP - Motilidade Progressiva  
MT - Motilidade total  
OPN - Osteopontina  
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida  
pI - Ponto isoelétrico  
PMM - Potencial de membrana plasmática  
PS - Plasma seminal  
RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro  
SDS - Dodecil-sulfato de sódio  
STR - Retilinearidade  
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco  
TIMP-2 - Metalloproteinase inibitor 2 precursor  
VAP - Velocidade do trajeto  
VSL - Velocidade progressiva  
VCL - Velocidade curvilínea  
WOB - Oscilação

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
Objetivo Geral .....	18
Objetivos Específicos .....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3.1 Vesícula seminal e fluido das glândulas vesiculares.....	19
3.1.1 Proteínas do fluído da vesícula seminal associadas à fertilidade.....	20
3.1.2 <i>Binder of Sperm Proteins</i> (BSP) .....	24
3.2 Purificação de proteínas .....	24
3.3 Criopreservação.....	28
3.3.1 Danos causados pela criopreservação.....	30
3.3.2 Componentes dos crioprotetores .....	30
3.3.2.1 Crioprotetores não penetrantes.....	31
3.3.2.2 Crioprotetores penetrantes.....	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	48
<b>Artigo 1</b> .....	48
RESUMO .....	48
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS .....	52
<i>Coleta e processamento do fluido seminal bovino</i> .....	52
<i>Precipitação das proteínas do fluido seminal bovino com sulfato de amônio</i> .....	52
<i>Eletroforese unidimensional</i> .....	53
<i>Western blot</i> .....	54
RESULTADOS .....	54
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES .....	55
AGRADACIMENTOS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
<b>Artigo 2</b> .....	61

RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
Coleta de semen.....	66
Congelamento de sêmen equino.....	66
Descongelação e avaliação <i>in vitro</i> dos espermatozóides.....	67
<i>Cinética espermática</i> .....	67
<i>Integridade de membrana plasmática</i> .....	67
<i>Integridade de acrossomal</i> .....	68
<i>Função mitocondrial</i> .....	69
Avaliação da longevidade dos espermatozoides pós-descongelamento.....	69
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
RESULTADOS.....	70
DISCUSSÃO.....	70
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO.....	80

## RESUMO

É relatado o efeito favorável de proteínas do plasma seminal de touro na célula espermática, incluindo capacitação, interação com o epitélio do oviduto com efeitos positivos na fertilização. Este trabalho teve como objetivo purificar o Binder of SPerm 1 (BSP1), proteína presente no fluido seminal de touros pela técnica de precipitação por sulfato de amônio e observar o efeito da adição dessa proteína na congelabilidade de sêmen de garanhões. Para tal, no experimento 1 foi realizada purificação parcial da proteína BSP1, através da precipitação com sulfato de amônio. Fluido seminal foi extraído das glândulas vesiculares de dez touros em abatedouro comercial. Após extração do fluido, foi utilizado um inibidor de proteases e um pool de todas as amostras foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , reservando-se uma alíquota para se determinar a concentração de proteína. Para acompanhar o processo de purificação, foram realizados SDS-PAGE e Western blot confirmando a presença de BSP1. Foi observada presença da proteína em todas as frações, em média 98%. De posse dessa proteína, foi realizado o experimento 2 avaliando-se o efeito da adição do BSP1 em sêmen de garanhões nas concentrações de 0 (Controle), 10, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$  ao diluente comercial (BOTUCRIO®), no sêmen de 4 garanhões da raça quarto de milha, totalizando 5 ejaculados por reprodutor. Após avaliação, sêmen foi centrifugado, diluídos para congelamento, acrescidos da proteína BSP1, e criopreservados com auxílio de máquina de congelação programável (TK 3000®). Houve diferença significativa nos parâmetros de velocidade espermática (ALH, BCF, WOB) tanto no tempo 0h como tempo 1 hora ( $P < 0.05$ ). Houve ainda diferença quanto ao potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides, quando adicionada a proteína na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , sendo inferior às demais concentrações e controle. A adição do BSP1 não provocou nenhuma alteração de IAC ou IMP, mesmo se tratando de espécies heterólogas comprovando que não houve dano à célula espermática do garanhão. Como o bovino apresenta uma alta fertilidade em relação ao garanhão, esse estudo possibilita uma perspectiva do uso de proteínas de espécies heterólogas na melhoria da qualidade seminal em garanhões.

Palavras-chave: BSP1, plasma seminal, garanhão, criopreservação.

## ABSTRACT

It is reported a beneficial effect of seminal plasma proteins from bulls in cryopreservation of several species. Some seminal plasma proteins has a positive effect on sperm cell, including sperm capacitation, interaction with oviductal epithelium with a positive effect on fertilization. This work aimed to purify the Binder of SPerm 1 (BSP1), protein present in the seminal fluid of bulls by ammonium sulfate precipitation and observe the effect of addition of this protein in stallion semen congelability. In experiment 1, BSP1 purification was performed by precipitation with ammonium sulfate technique. Seminal fluid was extracted from vesicular glands obtained from ten bulls in a commercial slaughterhouse. After extraction, a protein inhibitor was used and a pool of all samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , separating a portion to determine concentration. To check process of purification, SDS-PAGE and Western blot was performed confirming presence of BSP1. Protein presence was observed in all the fractions on average of 98%. With this protein, experiment 2 was conducted to evaluate the effect of addition of BSP1 to stallion semen at concentrations of 0 (control), 10, 20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to a commercial extender (BOTUCRIO®), in the 4 quarter horse stallions, in a total of 5 ejaculate by sire. After evaluation, semen was centrifuged, diluted to freeze adding BSP1 protein, in a freezing programmable machine (TK 3000®). Significant difference was seen in sperm kinetic parameters (ALH, BCF, WOB) both in “0” time and “1 hour” incubation time as well ( $P < 0.05$ ). There was also a difference in mitochondrial membrane potential, when added the protein at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , being lower than the other concentrations and control. The addition of the BSP1 did not cause any damage in acrosomal or plasma membrane integrity, even being from heterologous species. As the bull presentes a high fertility compared to stallion, this study provides a good perspective on the use of heterologous proteins in order to improve seminal quality in stallions.

Keywords: BSP1, seminal plasma, Stallion, cryopreservation.

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia de criopreservação tem apresentado desenvolvimento notório, tanto no melhoramento da qualidade do sêmen após seu processamento (JOBIM, 2011). Durante o processo da criopreservação e/ou descongelamento, são observados alguns danos, como a formação de cristais de gelo intracelulares; aumento da concentração intra-celular de solutos; e alterações resultantes da desidratação celular durante a congelação. As lesões celulares podem ter causas diretas, afetando estruturas celulares (ruptura de membranas); ou indiretas, alterando as funções celulares através do processo metabólico (HOLT, 2000).

Dentre os danos ocorridos na célula espermática durante o processo de criopreservação estão incluídas também injúrias e perdas de proteínas da superfície espermática (LASSO et al., 1994). A diferença entre a composição da membrana espermática do sêmen fresco e congelado pode ser a base molecular para as diferenças observadas na fertilidade do sêmen criopreservado (OLLERO et al., 1998).

Apesar dos grandes progressos alcançados com as técnicas da criopreservação do sêmen equino, ainda são obtidas perdas em torno de 50% de espermatozoides viáveis durante o processo (WATSON, 2000). Adicionalmente, sabe-se que grande parte dos ganhões não respondem bem ao uso desta biotécnica, havendo assim, um aumento significativo no número de pesquisas nesse sentido, com o objetivo de superar essa variação individual (VIDAMENT, 2005).

De acordo com Sullivan et al (1975) e Voss (1993) a espécie equina possui um dos menores índices de fertilidade, quando comparada com as demais espécies de produção. Parte desse resultado está correlacionado com o fato de que, os ganhões não são selecionados por sua fertilidade, como ocorre na seleção de reprodutores bovinos (MERKT, 1986; HUGUES, 1991).

Diversos estudos relataram efeitos benéficos da utilização do plasma seminal na criopreservação de diversas espécies tais como equinos (KATILA et al, 2002), bovinos (RONCOLETTA et al, 2002), humanos (BEM et al, 1997), suínos (METZ et al, 1990) e ovinos (GHAOUI et al, 2007). Aurich et al, (1996) relataram que espermatozoides de ganhões com baixa motilidade pós-descongelamento (<20%) apresentaram melhora

quando foram criopreservados com plasma seminal de garanhões que produziam espermatozoides com alta motilidade pós-descongelamento.

A expectativa de dispor de marcadores moleculares que auxiliem a indicação da fertilidade potencial do animal tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, que provavelmente poderão contribuir significativamente na escolha de reprodutores superiores (JOBIM et al, 2009; MOURA et al, 2011). Parâmetros como motilidade e morfologia espermática são bastante utilizados como método de avaliação dos aspectos da reprodução dos machos, mas ainda apresentam limitada relação com os índices de fertilidade “*in vivo*” (KILLIAN et al, 1993; MOURA, 2005; MOURA et al, 2006a, b, 2010). No entanto, os resultados mais significativos envolvendo tais índices indicam proteínas como potenciais candidatas a marcadores (JOBIM et al, 2009).

Segundo Moura et al, (2009), todas estas linhas de estudo pressupõem a hipótese de que os componentes moleculares dos espermatozoides, ou dos meios que os cercam, influenciam a capacidade fecundante de tais células, e as diferenças de fertilidade observadas entre os animais, não explicadas pelos testes de rotina para avaliação da qualidade do sêmen, relacionam-se com esses componentes.

Portanto, a avaliação proteômica dos fluidos reprodutivos fornece informações importantes para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos e, conseqüentemente, dos reprodutores (MOURA et al, 2011). Com o estudo da proteômica, é possível identificar e analisar as funções das proteínas presentes em diversos tipos celulares, incluindo os espermatozoides (MOURA et al, 2013).

As BSPs são uma das proteínas do plasma seminal mais estudadas nas espécies de mamíferos. Além de serem abundantes em ruminantes, os estudos realizados em touros confirmam o efeito diverso no espermatozoide, que incluem capacitação, interação com o epitélio do oviduto e fertilização. Esses estudos indicam que essas proteínas podem se tornar possíveis alvos para o desenvolvimento de novos marcadores de fertilidade, além de poder melhorar os resultados das Biotécnicas de reprodução assistida que ainda estão abaixo do desejável. (MOURA et al., 2016).

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição Binder of SPerm 1 (BSP1) de bovinos na congelabilidade de sêmen de garanhão.

### Objetivos Específicos

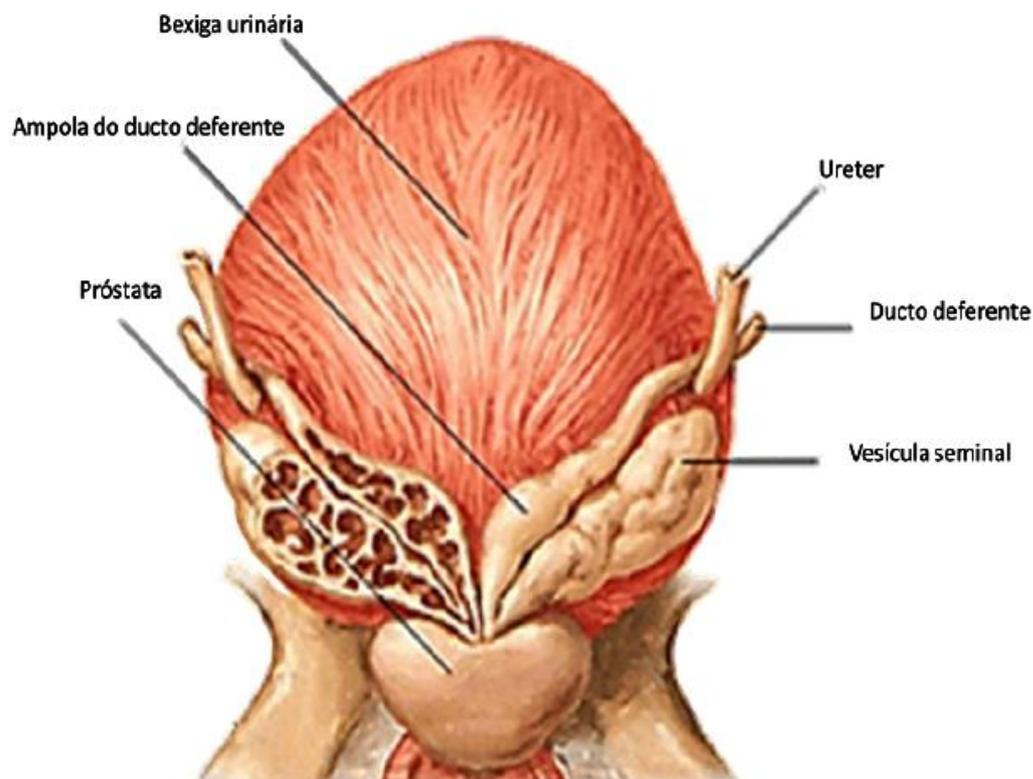
- Purificar a BSP1, proteína presente no fluido seminal de touros utilizando-se a técnica de precipitação por sulfato de amônio;
- Avaliar se a adição da proteína recombinante BSP1 com atividade homóloga ao sêmen equino pode ser correlacionada com a preservação da congelação do sêmen;
- Avaliação espermática pós-descongelamento com diluidor acrescido de BSP1 nas concentrações de 0, 10, 20 e 40 $\mu$ g/mL através dos parâmetros *in vitro* pelo sistema computadorizado CASA e integridade de membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial através de microscopia de epifluorescência.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Vesícula seminal e fluido das glândulas vesiculares

As vesículas seminais (Figura 1) se encontram lateralmente às ampolas, próximas à bexiga. Em bovinos, ovinos e caprinos, esses órgãos são firmes e lobulados apresentando lúmen estreito, enquanto em equinos e suínos, assemelham-se a uma bolsa (CUNNINGHAM, 2014). Os pares de vesículas seminais secretam um fluido viscoso e amarelado com 70% frutose. Embora este líquido também seja constituído de aminoácidos, citratos, prostaglandinas e proteínas, a frutose é o principal componente, uma vez que ela atua como fonte de energia para os espermatozoides (GARTNER, 2007). Por sua vez, o fluido apresenta a função de nutrir e facilitar a motilidade dos espermatozoides, e devido sua natureza alcalina, ajudar a neutralizar o ambiente ácido da uretra masculina e trato genital feminino (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Figura 1 - Vista anterior da vesícula seminal de touro.



Fonte: Netter (2000).

A identificação dos componentes proteicos do ejaculado já mostravam o fluido seminal como uma complexa mistura de diferentes proteínas (LARSON; SALISBURY, 1954). Contudo, o aperfeiçoamento de métodos na área de proteômica permitiu novas análises do conteúdo do plasma seminal (GEORGIEV, 1978), sendo que uma das principais colaborações, foram as indicações de que determinadas proteínas presentes no fluido das glândulas vesiculares poderiam servir como possíveis marcadores de fertilidade e até da congelabilidade do sêmen bovino (JOBIM et al., 2004; MOURA et al.; 2006b).

Proteínas presentes no fluido das glândulas vesiculares estão envolvidas na motilidade e metabolismo espermático, equilíbrio osmótico, além de exercerem diversas outras funções nos diferentes estágios do processo de fertilização (SHIVAJ et al., 1990; SOUSA, 2015).

### **3.1.1 Proteínas do fluido da vesícula seminal associadas à fertilidade**

O plasma seminal (PS) consiste em um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas anexas, sendo expelido em frações durante a ejaculação através de contrações (KARESKOSKI, 2008). O PS exerce diversas funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação, tais como: ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, capacitação espermática, entre outros (ELZANATY, 2002; TROEDSSON et al, 2005)

Considerando a função do PS, a análise dos fluidos reprodutivos fornece informações cruciais para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos (MOURA et al., 2011). As glândulas sexuais acessórias produzem as secreções do ejaculado que entram em contato com os espermatozoides produzindo ambiente nutritivo e de proteção para que o mesmo entre em contato com o trato reprodutivo da fêmea.

Dessa forma, as proteínas presentes no PS quando adsorvidas à superfície da membrana espermática são capazes de modular a capacitação espermática (MANJUNATH et al., 1994) e desempenham um papel importante na estabilização dos espermatozoides, uma vez que conferem estabilidade à membrana plasmática e

participam de processos como formação de reservatórios espermáticos e interação espermatozoide-oócito, (JUYENA; STELLETTA, 2012).

Proteínas específicas já são utilizadas como marcadores de fertilidade para humanos e quase todos os animais de produção (MEMILI, 2016). A proteína ácida do fluído seminal bovino (aSFP), a BSP1, a clusterina, a albumina e a osteopontina (OPN), foram as proteínas do PS bovino relacionadas com a alta congelabilidade seminal; podendo assim, serem indicadas como possíveis marcadores (JOBIM et al, 2009). Nos equinos algumas proteínas também já foram identificadas, como a família de proteínas ricas em cisteína (CRISPs), a família das espermedesinas e a família de proteínas com número variável de domínios de fibronectina do tipo II (Fn-2) (MURADAS et al, 2013).

A albumina apresenta peso molecular de 66,0 kDa e pI 5,4, e quando adicionada ao sêmen favorece sua motilidade (JOBIM et al, 2009), possuindo também uma capacidade de absorver peróxidos de lipídios, contribuindo assim com um efeito protetor na membrana espermática (ALVAREZ & STOREY, 1983; JOBIM et al., 2004). Segundo Elzanaty et al, 2007, a albumina apresenta correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais no ejaculado de bovinos. Consequentemente, a maior quantidade de albumina no PS dos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen, pode estar relacionada à capacidade da albumina em participar de modificações de permeabilidade da membrana espermática (JOBIM, 2001; JOBIM et al, 2002).

Outra proteína com funções protetoras do espermatozoide é a clusterina, que atua solubilizando proteínas parcialmente desestruturadas diminuindo a citotoxicidade da precipitação proteica induzida por estresses celulares (HUMPHREYS et al, 1999). Por sua vez, a clusterina possui atividade de chaperona, interagindo com proteínas danificadas e corrigindo-as ou levando-as a sua degradação, protegendo assim as células do efeito citotóxico oriundo da precipitação proteica (IBRAHIM et al., 1999; BAILEY et al., 2002).

A clusterina também tem sido associada à inibição da lise pelo sistema complemento presente no epidídimo e nas secreções uterinas, auxiliando assim a viabilidade do espermatozoide durante o trajeto no trato reprodutor feminino (MERI & JARVA, 2001). A correlação positiva entre clusterina do plasma seminal e a congelabilidade do sêmen sugere que esta proteína exerce efeito sobre o transporte e

redistribuição de lipídios no plasmalema, o que reduziria os danos à membrana espermática durante a criopreservação (JOBIM et al, 2004). Segundo Souza et al, 2008, a quantidade de clusterina e albumina no fluido das glândulas sexuais anexas de touros, está correlacionada com a capacidade fecundante de espermatozoides epididimário tratados com este fluido, “*in vitro*” (SOUZA et al, 2008).

Tendo em vista a localização da clusterina na membrana espermática e seu papel no transporte e redistribuição de lipídeos, esta proteína poderia apresentar funções biológicas semelhantes às da BSP na proteção da função da membrana espermática, no processo da criopreservação do sêmen (JOBIM et al, 2004).

A proteína aSFP é secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo. Além disso, é conhecida por ser membro da família das espermadesinas (12 - 26 kDa) (ROMERO et al., 1997). A aSFP liga-se a superfície do espermatozoide ejaculado (HAASE et al., 2005).

Dessa forma, acredita-se que ela atue como fator decapacitante do espermatozoide e não como molécula de ligação da zona pelúcida (DOSTALOVA et al., 1994).

Ressalta-se uma alta atividade antioxidante associada a aSFP devido a presença de pontes dissulfeto, que auxiliam na manutenção das membranas plasmáticas íntegras e funcionais (EINSPANIER et al., 1993; MOURA et al., 2007). A adição de aSFP purificada ao sêmen bovino apresenta influência significativa nas características seminais, no qual foi observada redução na motilidade dos espermatozoides, utilizando concentração de 6,0 g/L, além de redução da atividade mitocondrial com a adição de 4,0 g/L (SCHONECK; BRAUN; EINSPANIER; 1996).

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína ácida, que possui diversas funções, detectada em várias espécies, onde se liga aos espermatozoides por ocasião da ejaculação (SOUZA et al, 2008). Essa glicoproteína de *pI* 4,5, foi inicialmente identificada na matriz óssea bovina, estando associada à grande quantidade de ácido aspártico e glutâmico na matriz óssea (FRANZEN; HEINEGARD, 1985). A presença da OPN no plasma seminal de touros se refere principalmente a secreções da ampola e vesícula seminal e possivelmente pelo epidídimo e próstata (RODRÍGUEZ; DAY; KILLIAN, 2000).

A OPN possui funções como adesão celular, o que sugere sua participação na interação entre espermatozoide e oócito (GONÇALVES et al, 2007), no remodelamento de membranas, nas alterações no citoesqueleto e na modulação imunológica (DENHARDT, 2004).

Uma hipótese para o mecanismo de ação da OPN no processo de fertilização, apoia-se no conceito de que, durante a ejaculação, a OPN proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias liga-se à membrana espermática através das integrinas e esse complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (MOURA, 2005).

A OPN também induz a capacitação do espermatozóiide bovino, através de mecanismos indeterminados, tendo igualmente um efeito positivo na viabilidade espermática, provavelmente por meio de bloqueio de vias apoptóticas (ERIKSON et al, 2007). A análise proteômica do plasma seminal de animais *Bos taurus* mostrou que a expressão da OPN apresentou significativa correlação com os índices de fertilidade avaliados por meio das taxas de não retorno ao cio de vacas inseminadas e em sistemas de fertilização *in vitro* (MOURA et al, 2006).

A TIMP-2 (Metalloproteinase inibitor 2 precursor) se liga ao espermatozoide de touros logo após a ejaculação, o que sugere que a mesma participe do processo de interação entre gametas (CORREA et al., 2000; RÊGO, 2014). Essa proteína atua de modo a integrar um sistema proteolítico envolvido na reação acrossômica e interação entre gametas (MCCAULEY et al., 2001). Ela apresentou sua expressão de RNAm detectado em todos os tecidos das glândulas sexuais acessórias de touros, e posteriormente foi identificada no fluido das glândulas vesiculares (MCCAULEY et al., 2001; MOURA et al., 2007; RÊGO, 2014).

### **3.1.2 Binder of Sperm Proteins (BSP)**

As proteínas BSPs compreendem a maior parte do PS bovino (KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007). Nos ruminantes se originam principalmente das glândulas sexuais acessórias, enquanto que a sua expressão em camundongos e humanos ocorrem no epididídeo (MANJUNATH et al., 2009). As proteínas de ligação de fosfolípidos, pertencentes à família das BSPs estão presentes no plasma seminal de várias espécies,

incluindo touros, carneiros, homens, roedores e garanhões (MOURA et al, 2007a; SOUZA et al, 2012; MANJUNATH et al, 2009; PLANTE et al, 2016), como também proteínas homólogas as BSP's foram identificadas no plasma seminal de equinos (HSP1, HSP2, EQ12) (CALVETE et al, 1995).

As proteínas que fazem parte dessa família possuem a capacidade de interagir com fosfolipídios, contendo colinas, presentes na membrana dos espermatozoides no momento da ejaculação. Vale ressaltar que elas são capazes de se ligar ao LDL de forma rápida e saturável, e essa interação tem efeitos consideráveis na preservação da função espermática (BERGERON et al., 2004).

As BSPs são compostas de peptídios de cadeia única e apresentam dois domínios semelhantes à fibronectina tipo II, característica que lhes proporcionam capacidade de ligação a fosfolipídios (CALVETE et al, 1996). Estudos têm demonstrado que as BSPs ligam-se aos espermatozoides no momento da ejaculação, promovendo a remoção de fosfolipídios e colesterol (THÉRIEN et al, 1998; 1999), o que implica na diminuição da proporção colesterol/fosfolipídio, um dos requisitos à capacitação do espermatozoide (MOURA et al, 2011).

Além disso, estas proteínas permanecem ligadas à membrana espermática durante o trajeto no trato reprodutor feminino e, ao atingirem o oviduto, auxiliam na interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto, além de atuarem como chaperones sob condições de estresse (GWATHMEY et al, 2006; SOUZA et al, 2008; RÊGO, 2014; SUAREZ, 2016).

O fato de as BSPs interagirem com componentes dos extensores de sêmen sugerem que essas proteínas são possíveis alvos para o desenvolvimento de novos marcadores de fertilidade e biomoléculas que podem melhorar as tecnologias de reprodução assistida (MOURA; MEMILI, 2016).

### **3.2 Purificação de proteínas**

O processo de purificação de proteínas tem como objetivos principais a obtenção da amostra pura para melhor compreensão de suas características estruturais e bioquímicas, além de um produto com maior atividade específica para aplicação em diversos processos (KOBBLITZ et al., 2004). A metodologia de purificação de proteínas utiliza como ponto de partida as características de cada proteína para separá-las. Em que

essas características envolvem o peso molecular, carga de superfície, hidrofobicidade e afinidade por alguns ligantes. Essas metodologias utilizadas, tais como centrifugação, diálise e cromatografias são realizadas em sequência de modo a obter a amostra purificada (MORAES et al., 2013).

A solubilidade de uma proteína pode variar de acordo com a concentração de sal a qual ela é submetida. Quando submetida à baixa concentração de sal, observa-se um aumento na solubilidade das proteínas com a presença de íons. Este fenômeno é denominado de *salting in*, onde ocorre uma interação entre os íons salinos e os grupamentos carregados das proteínas diminuindo as interações eletrostáticas intermoleculares proteína-proteína (responsáveis pela diminuição da solubilidade proteica). Por outro lado, em elevadas concentrações salinas, ocorrem redução na solubilidade das proteínas. Este processo é chamado de *salting out*, em que alguns sais, ao interagirem com a água, removem a camada de solvatação das proteínas, facilitando a formação de agregados levando a sua precipitação (MORAES et al., 2013).

A precipitação por este sal, é um método usado para purificar proteínas alterando sua solubilidade, através da técnica conhecida como *salting out*. O sulfato de amônio é comumente usado porque sua solubilidade é tão alta que são permitidas soluções salinas com elevada força iônica (MORAES et al., 2013).

Dois efeitos distintos são observados: em baixas concentrações de sal, a solubilidade da proteína aumenta com o aumento da concentração de sal (aumentando a força iônica), um efeito conhecido como salga. À medida que a concentração salina (força iônica) é aumentada, a solubilidade da proteína começa a diminuir. Em força iônica suficientemente alta, a proteína será quase completamente precipitada da solução (*salting out*). O sal comumente usado é sulfato de amônio, como é muito solúvel em água, é geralmente utilizado como uma solução aquosa saturada que é diluída para a concentração necessária, expressa como uma concentração percentual da solução saturada (uma solução a 100%) (JUMP, 2013).

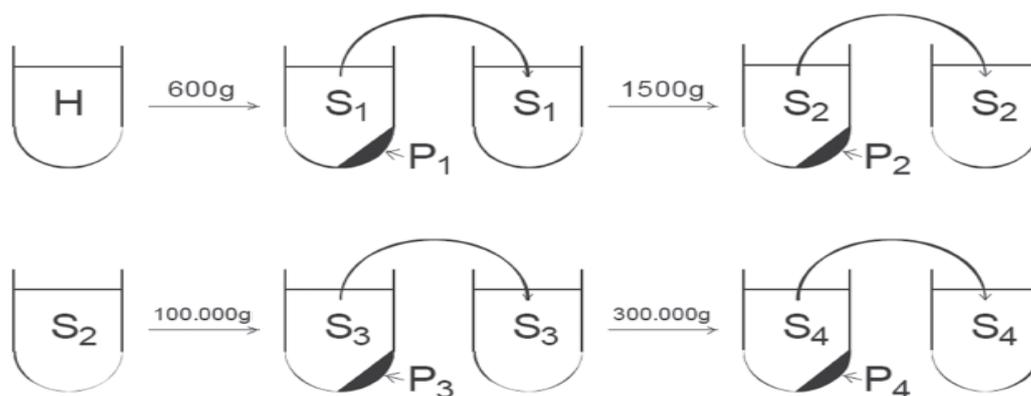
A concentração de sulfato de amônio é aumentada passo a passo, e a proteína precipitada é recuperada em cada estágio. Esse processo geralmente é feito pela adição de sulfato de amônio sólido, com objetivo de encontrar a concentração de sulfato de amônio que irá precipitar a proporção máxima de proteína indesejada, deixando a maior parte da proteína ainda em solução ou vice-versa (JUMP, 2013).

A proteína precipitada é então removida por centrifugação e depois à concentração de sulfato de amônio é aumentada para um valor que irá precipitar a maior parte da proteína de interesse enquanto deixa a quantidade máxima de contaminantes proteicos ainda em solução. A proteína de interesse é recuperada por centrifugação e dissolvida em tampão fresco para o próximo passo de purificação (JUMP, 2013).

Esta técnica é útil para remover rapidamente grandes quantidades de proteínas contaminantes, como primeiro passo em muitos esquemas de purificação. É também frequentemente utilizado durante os últimos estágios de purificação para concentrar a proteína a partir da solução diluída seguindo procedimentos tais como a diálise (JUMP, 2013).

A técnica de centrifugação torna possível a obtenção de frações subcelulares e/ou organelas. Nesta técnica, a separação de pequenas e grandes partículas ocorre pela aplicação de diferentes forças centrífugas ao extrato celular. As partículas maiores e mais densas sedimentam primeiro, ficando no sobrenadante as partículas pequenas e menos densas (figura 2) (ROSA, 2012).

Figura 2 – Esquemática do processo sedimentação diferencial por centrifugação de homogeneizado celular com diferentes forças centrífugas relativas (em g).



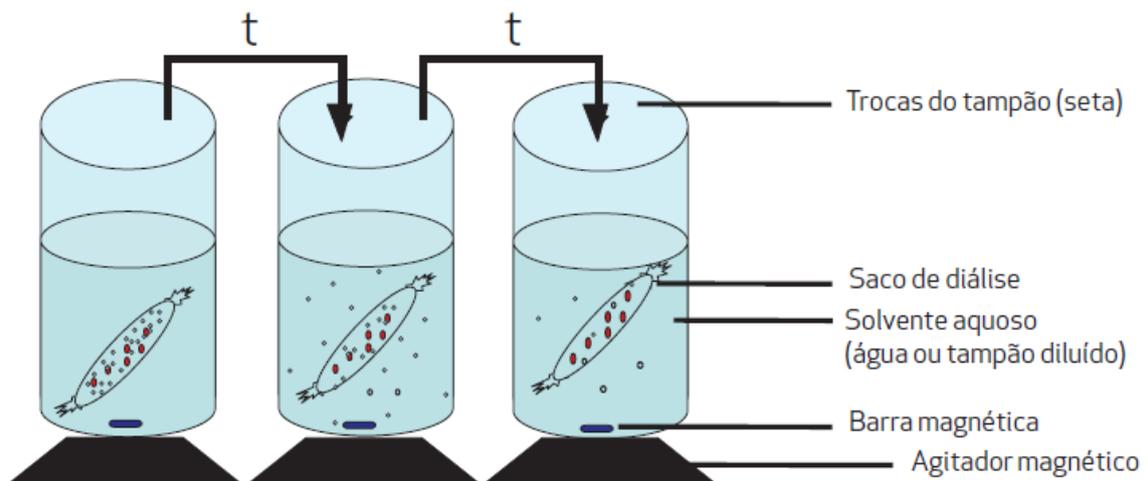
H = homogeneizado; S = Sobrenadante; P = precipitado.

Fonte: Rosa, 2012.

A diálise é um método utilizado para separar moléculas através do seu tamanho utilizando uma membrana semipermeável com tamanho do poro definido, de maneira a permitir a passagem seletiva de moléculas. Na prática, uma mistura heterogênea

composta por moléculas grandes e pequenas é colocada em um saco de diálise, no qual é posteriormente imerso em um grande volume de solvente aquoso. As pequenas moléculas podem atravessar a membrana para o fluido externo e as moléculas maiores ficam retidas (Figura 3). O fenômeno pelo qual favorece a passagem de moléculas pequenas através da membrana é a difusão, propiciada pela diferença de concentração destas entre a solução presente no interior do saco de diálise e no seu exterior. O fluxo de difusão das partículas ocorre de acordo com o seu gradiente de concentração, indo da região de maior concentração para uma de menor concentração até que se atinja o equilíbrio, ou seja, com concentrações iguais nos dois compartimentos (HABERT et al, 2003).

Figura 3 – Esquema de separação de moléculas por saco de diálise, composto por uma membrana semipermeável, contendo uma mistura de proteínas imersa em tampão.



Fonte: Habert et al, 2003.

A eficiência de uma diálise depende, da razão entre os volumes dos compartimentos na diluição do soluto no equilíbrio, onde utilizam-se compartimentos externos com grandes volumes (da ordem de 1 litro) para amostras contidas em sacos de diálise pequenos (da ordem de 1 mL); da permeabilidade da membrana, onde quanto mais permeável à membrana as partículas do soluto em questão, maior será a taxa de difusão destas para o compartimento externo; da natureza do solvente, onde, solventes muito viscosos tendem a apresentar taxas de difusão menores; da temperatura, pois quanto maior a temperatura maior a taxa de difusão; do gradiente de concentração, em que,

quanto maior a diferença entre as concentrações nos dois compartimentos, maior será a taxa de passagem de partículas do soluto; do número de trocas do tampão e diluição, onde, quanto maior o número de trocas da solução externa, maior será a remoção das partículas do soluto, pois ocorrerá uma diluição seriada, e por fim da agitação do solvente, no qual é absolutamente necessário que o solvente no compartimento externo esteja em agitação, para que o equilíbrio entre os dois compartimentos seja atingido em um tempo razoável (algumas horas) (HABERT et al, 2003).

### **3.3 Criopreservação**

A criopreservação de sêmen equino vem crescendo por proporcionar a possibilidade de um melhor aproveitamento genético de animais de grandes valores econômicos e zootécnicos, devido à facilidade de transporte e armazenamento do material genético de garanhões por longo período de tempo (OLIVEIRA et al., 2013a).

Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa e isto dificulta a sua utilização em larga escala, pois o uso do sêmen equino congelado encontra dificuldades pelas diferenças individuais de congelabilidade espermática existente entre garanhões, ejaculados do mesmo indivíduo e também pela reduzida capacidade dos espermatozoides equinos de resistirem aos danos causados pelos processos de congelamento e descongelamento (CANDEIAS, 2010).

No entanto a utilização da criopreservação de sêmen equino apresenta vantagens como armazenamento do sêmen congelado por tempo indeterminado; utilização do sêmen de animais excepcionais mesmo após a perda da capacidade reprodutiva ou morte; maximização do número de descendentes de um único reprodutor; controle de doenças sexuais e facilidade no transporte a longas distâncias (DE VITA et al., 2011).

De acordo com KEITH (1998), no processo de criopreservação o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea (37 °C) à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), o que parece não ocasionar maiores danos ao espermatozoide, desde que seja diluído em meio adequado. O estresse começa quando o espermatozoide atinge a temperatura de 5 °C, passando do estado líquido para a fase de gel (DE VITA, 2006).

Várias técnicas têm sido testadas para a criopreservação espermática utilizando diferentes velocidades e meios de centrifugação, curvas e meios de congelamento,

crioprotetores e suas concentrações, bem como protocolos de descongelamento, embora ainda não haja uma metodologia de congelamento universalmente específica para a espécie (Oliveira, 2013).

O processo de descongelamento depende do método em que o sêmen foi congelado, a curva de aquecimento deve acompanhar a velocidade com que ocorreu o congelamento. Assim se a curva de congelamento utilizada foi lenta, a de descongelamento também deve ser lenta, permitindo a reidratação da célula e quebrando os cristais de gelo intracelulares. E vice-versa, caso o sêmen tenha sido congelado rapidamente, também deve ser descongelado na mesma velocidade possibilitando assim que o gelo intracelular formado não tenha tempo de recristalizar (AMMAN E PICKETT, 1987).

As máquinas de congelamento automático e programáveis surgiram com o intuito de facilitar e objetivar o processo de criopreservação. Estão sendo utilizadas por serem convenientes para o congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen, além de controlar a taxa de congelamento. O benefício do congelamento automatizado é que a curva de refrigeração pode ser programada, por exemplo, 4 a 5° C por 4 min., de -5 a -110° C por 25 min. e de -110 a -140° C por 35 min. e, somente então, as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (PURDY, 2006).

Para diminuir os danos causados pelo frio deve-se atentar ao controle da taxa de resfriamento entre 19 °C e 8 °C e, também, pela adição de lipídeos e lipoproteínas ao diluente, além da utilização de curvas lentas de resfriamento e uso de crioprotetores (FURST, 2006). Entre -5 °C e -10 °C inicia-se a formação de cristais extracelulares que permanecem super-resfriados; logo, ocorre a troca de água entre os meios intra e extracelulares para manter a osmolaridade, levando assim a desidratação das células (FURST, 2006; DE VITA, 2006).

A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois estes reduzem a probabilidade de formar cristais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (SQUIRES et al, 1999). No entanto, a desidratação severa promove desnaturação de macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, ocasionando um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

Portanto, nesse ponto a curva de congelamento deve ser rápida o suficiente para evitar o contato do espermatozóide desidratado com o meio hiperosmótico, porém lenta o suficiente para que a água intracelular não congele (FURST, 2006; DE VITA, 2006).

Apesar de apresentar baixa eficiência, por mostrar diferenças individuais com relação a sua preservação (LAGARES et al., 2000) a criopreservação de sêmen equino faz-se necessária devido as exigências do mercado, pois viabiliza a criação de bancos de armazenamento de material genético de alto valor agregado por longos períodos (TERRACIANO et al., 2008).

### **3.3.1 Danos causados pela criopreservação**

Os espermatozoides são susceptíveis a danos durante toda a etapa de criopreservação, desde a colheita até a inseminação (GRAHAM, 1996; DE VITA, 2006). O processo de criopreservação induz uma diminuição da viabilidade da célula espermática no pós-descongelamento, condicionando alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais determinadas pelo processamento seminal, como, a diluição, o resfriamento, o armazenamento, o congelamento e o reaquecimento espermático (MARTINS, 2009).

Logo, as lesões ocasionadas são advindas de vários fatores, tais como: a formação de cristais de gelo intracelular devido à mudança de temperatura, alteração na permeabilidade da membrana do espermatozoide, toxicidade dos crioprotetores e o estresse osmótico, associado à adição ou a retirada de crioprotetores (WATSON, 2000; FURST, 2006).

O uso de crioprotetores é de fundamental importância; no entanto, este também possui efeitos tóxicos, podendo ocorrer efeitos deletérios como aumento da permeabilidade da membrana plasmática (DE VITA, 2006).

### **3.3.2 Componentes dos crioprotetores**

Como maneira de otimizar a qualidade do sêmen, precisa-se acrescentar crioprotetores com função de proteger as células e tecidos, independente das técnicas ou protocolos utilizados, dos efeitos deletérios causados na morfologia dos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento (ALVARENGA et al., 2005).

Um crioprotetor ideal deve proporcionar: pressão osmótica compatível com a dos espermatozoides; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as mudanças de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilizar membranas e sistema enzimático; ambiente livre de microorganismos patogênicos; baixo custo; não oferecer toxicidade ao espermatozoide; baixa irritabilidade ao sistema genital e fácil aquisição (CANISSO et al., 2008; AIDAR, 2013).

### **3.3.2.1 Crioprotetores não penetrantes**

Classificam-se nesta categoria os açúcares (lactose, frutose, rafinose ou trealose) e os polímeros sintéticos (metil celulose). Os crioprotetores não penetrantes protegem as células basicamente por meio de efeitos osmóticos, onde que, em suspensão em meio hipertônico, as células perdem seu conteúdo de água, o que reduz a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular, onde que esses componentes agem como soluto ou colóides, não servindo como solventes (GRAHAM, 1996).

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de criopreservação, sem que para isto precisem penetrar no espermatozoide. São estes a gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (KEITH, 1998).

A gema de ovo é comumente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico (MOUSSA et al, 2002). Sua ação se dar pela presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando a membrana do espermatozoide atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídeos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, consequentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (MOUSSA et al, 2002).

### **3.3.2.2 Crioprotetores penetrantes**

São substâncias que atuam tanto no meio intracelular como no extracelular. Os mais rotineiramente utilizados são o glicerol, o etilenoglicol, o DMSO e as amidas

(KEITH, 1998). WATSON (2000), sugere que estas substâncias atuem através de propriedade coligativa com a água, ou seja, reduzindo seu ponto de congelamento. Uma solução que contém glicerol, por exemplo, disporá de mais água não congelada do que outra sem o glicerol, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados, diminuindo a concentração de sais das porções não congeladas. Portanto, atuam tanto como solvente quanto como soluto.

A descoberta da ação do glicerol foi de grande importância na criopreservação de sêmen, pois até então este evento não era possível e ainda é o agente mais utilizado (HOLT, 2000). O glicerol penetra na membrana celular por meio de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma (PARKS & GRAHAM, 1992), reduz o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, das interações com íons e macromoléculas, assim como pela redução do ponto de congelamento da água (MEDEIROS et al., 2002).

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen equino pode estar relacionado à baixa motilidade pós-descongelamento e redução da fertilidade (GOMES et al., 2002). O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores (WATSON, 1995; AGCA & CRITSER, 2002), onde sua toxicidade parece causar desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, atuação direta na membrana plasmática, alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (ALVARENGA et al., 2000a).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozoide é espécie dependente, e varia de acordo com a curva de congelamento, de outros componentes do diluente e ainda do método de envase. Em bovinos, varia entre 7 a 9%, nos caprinos, de 3 a 4%, em cães varia de 2 a 10% e em humanos é congelado com 5 a 10 % (FARSTAD, 1996). Em equinos, existem grandes variações nas concentrações de glicerol utilizadas, mas se considera necessário o uso de um percentual inferior ao que é utilizado para bovinos (KEITH, 1998).

Em estudo comparativo do glicerol e outros crioprotetores, dentre eles etileno glicol, dimetil formamida e dimetil sulfoxido, em que foram utilizados 10 ejaculados de 10 garanhões, constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do

dimetil sulfoxido, que apresentou resultado inferior (ALVARENGA et al., 2000b). Outro estudo comparativo entre etilenoglicol e glicerol demonstrou atuação semelhante destes, que quando combinados, possibilitou a redução do teor de glicerol, reduzindo assim o seu efeito tóxico (ALVARENGA et al., 2000a).

Dimetilformamida e metilformamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso no congelamento de sêmen equino. Seu uso para congelamento de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (KEITH, 1998).

Porém, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação, manifestou melhores resultados quando comparados com o glicerol. O uso combinado de crioprotetores confere maior proteção em relação ao seu uso isolado (GOMES et al., 2002).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y. ;CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 21, p. 15-23, 2002.

AIDAR, N.B. **Criopreservação de sêmen equino**. Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v. 46, p. 791-797.1996.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Vet. J.**, v. 32(6), p. 541-545, 2000a.

ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. **Proc. Int. Congr. Anim Reprod.**, p. 157, 2000b. (abstract).

ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105–113, 2005.

ALVAREZ, J.G.; STOREY B.T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. **Biol Reprod**, v.28, p.1129-1136, 1983.

AMANN RP, PICKETT BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ARRUDA R.P.; Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 121f. **Tese (Livre Docência)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

BAILEY R. W.; ARONOW B.; HARMONY J.A.; GRISWOLD M.D. Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ apoJ knock-out mice. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1042-1053, 2002.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A.. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BEN, W.X. et al. Effect of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. **Archives of Andrology**, v. 39, p. 211-216, 1997.

BERGERON A.; CRÊTE M.H.; BRINDLE Y.; MANJUNATH P. Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**. v.70, p.708–717, 2004.

BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248, 1976.

CANDEIAS, M. L. Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga marchador. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2010.

CANISSO, I.F. et al. Inseminação artificial em eqüinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CALVETE, J.J. et al. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochem J**, v. 310, p. 615-622, 1995.

CALVETE, J.J. et al. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Lett**, v. 399, p. 147-152, 1996.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal**, 3ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 24, p. 101-104, 2002.

CUNNINGHAM. **Tratado de fisiologia veterinária** / Bradley G. Klein. - 5. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier., 2014.

CÔRREA, L.M.; CHO, C.; MYLES, D.G; PRIMAKOFF, P. A role for a TIMP-3-sensitive, Zn<sup>2+</sup>-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. **Developmental Biology**, v. 225, n.1, p. 124-134, 2000.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p. 831-841, 1997.

D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Front Biosci**, v. 1, p. 161-176, 1996.

DENHARDT, D.T. The third international conference on osteopontin and related proteins, 3, 2002, San Antonio, TX. **Calcif Tissue Int**, v.74, p.213-219, 2004.

DE VITA, B. Biotecnologia e inseminação artificial com sêmen congelado equino. **Monografia (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

DE VITA, B. et al. Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen equino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 120 - 125, mar. 2011.

DOSTALOVA Z.; CALVETE J.J.; SANZ L.; HETTEL C.; RIEDEL D., SCHONECK C., EINSPANIER R.; TOPFER-PETERSEN E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacited bull spermatozoa. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, p. 457-461, 1994.

EINSPANIER R.; AMSELGRUBER W.; SINOWATZ F.; HENLE T.; ROPKE R.; SCHAMS D. Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Standford, v.98, p. 241-244, 1993.

ELZANATY, S. et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Hum Reprod**. v. 7, p. 2904-11, 2002.

ELZANATY, S; ERENPREISS, J; BECKER, C. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. **Andrologia**, v. 39, p. 60-65, 2007.

ERIKSON, D.W. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**. v. 133, p. 909-917, 2007.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v. 3, p. 1-13, 1996.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FRANZEN A.; HEINEGARD D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, p. 715-724, 1985.

FURST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

GARTNER L.P.; HIATT J.L. **Tratado de histologia em cores** / Leslie P. Gartner e James L. Hiatt; – Rio de Janeiro : Elsevier, 2007.

GEORGIEV G.H. Isoelectric focusing of bull seminal plasma proteins. **International Journal of Biochemistry**, Amsterdam, v. 9, p. 327-330, 1978.

GERENA RL, IRIKURA D, URADE Y, EGUCHI N, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biol Reprod**, v.58, p.826-833, 1998.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.

GONÇALVES, R.F; WOLINETZ, C.D; KILLIAN, G.J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha v$  and  $\alpha 5$ ) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 468-474, 2007.

GHAOUI, R.E. et al. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v. 42, p. 541–549, 2007.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GWATHMEY TM, IGNOTZ GG, MUELLER JL, MANJUNATH P, SUAREZ SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biol Reprod**, 75:501-507, 2006.

HAASE B.; SCHLOTTERER C.; HUNDRIESER M.E.; KUIEPER H.; DISTL O.; TOPFER-PETERSEN E.; LEEB T. **Evolution of the espermedesins gene family. Gene**, Nova York, v. 352, p. 20-29, 2005.

HABERT, A.C.; BORGES C.P.; NOBREGA R. Processos de separação com membranas. **Escola Piloto em Engenharia Química**, COPPE/UFRJ, 2003.

HINTON, B.T. et al. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, p. 731-745, 1995.

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

HUGUES, J.P. **Curso de Equinos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte : CBRA, 1991.

HUMPHREYS DT, CARVER JA, EASTERBROOK-SMITH SB, WILSON MR. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **J Biol Chem**, v.274, p.6875-6881, 1999.

IBRAHIM N.M.; ROMANO J.E.; TROEDSSON M.H.; CRABO B.G. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 863–77, 1999.

JOBIM, M.I.M. et al. Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen 1. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 26, p. 296-305, 2002.

JOBIM, M.I.M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, p. 255-266, 2004.

JOBIM, M.I.M. et al. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, n.6, p. 25-31, dez. 2009.

JOBIM, M.I.M. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino. 2001. 156f. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

JUMP, U.P., Ammonium Sulfate Calculator. **EnCor Biotechnology Inc**. Retrieved 19 April 2013.

JUYENA N.S.; STELLETTA C. Seminal Plasma : An Essential Attribute to Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p.536–551, 2012.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Anim Reprod Sci**. v.107, p. 249-56, 2008.

KATILA, T.; et al. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 58, p. 241-244, 2002.

KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. **Dissertação (Doutorado)** – Colorado State University, 1998.

KELLY V.C.; KUY S.; PALMER D.J.; XU Z.; DAVIS S.R.; COOPER G.J. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5826-5833, 2006.

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

KOBLITZ M.G.B.; PASTORE M.G. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 287-292, 2004.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **J Reprod Immunol**, v. 65, p. 33-46, 2005.

LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, set./dez, 2000.

LASSO, J.L.; NOILES, E.E.; ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **J androl**, 15 (3), 255-265, 1994.

LARSON B. L.; SALISBURY G.W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretic studies. **Journal Biology Chemistry**, v. 206, n.2, p. 741-749, 1954.

MANJUNATH P.; CHANDONNET I.; LEBLOND E.; DESNOYER L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.50, p.27-37, 1994.

MANJUNATH, P. et al. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biol Reprod**, v. 80, p. 394-397, 2009.

MARTINS, C.F. Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e funcional. **Tese de doutorado pela Universidade de Brasília** - Faculdade de Ciências Biológicas. Brasília/DF. p.110, 2006.

MCCAULEY, T.C.; ZHANG, H.M.; BELLIN, M.E.; AX, R.L. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, n.3, p.336-341, 2001.

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

MERI, S.; ARVA, H. Complement regulatory proteins. In: **Nature encyclopedia of life sciences**. London: Nature Ed, p.1-7, 2001.

MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: **ENCONTRO NACIONAL DE EQÜIDOCULTURA**, 4, 1986, São Paulo, SP. Anais... São Paulo : Sociedade Brasileira de Hipologia, 1986. p.33-34.

METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 34, p. 691-700, 1990.

MEMILI, E.; KAYA, A. Sperm macromolecules associated with bull fertility. **Anim Reprod Sci**, 169:88-94, 2016.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

MOURA, A.A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Anim Reprod**, v. 2, p. 3-10, 2005.

MOURA, A.A. et al. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J Androl**, v. 27, p. 201-211, 2006a.

MOURA A. A.; HASAN K.; CHAPMAN DAVID A.; GARY J.K. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006b.

MOURA A.A.; CHAPMAN D.A.; KOC H.; KILLIAN G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, 2007.

MOURA, A.A. et al.. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **J Proteomics**, v. 73, p. 2006-20, 2010.

MOURA, A.A. et al. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.

MOURA, A.A.A., MEMILI, E. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. **Anim. Reprod.**, v.13, n.3, p.xxx-xxx, Jul./Sept. 2016.

MORAES C.S.; OLIVEIRA JUNIOR F.O.R.; MASSON G.; REBELLO K.M.; SANTOS L.O.; BASTOS N.F.P.; FARIA R.C.R. Métodos experimentais no estudo de proteínas. (**Série em biologia celular e molecular**). Rio de Janeiro: IOC., p. 84, 2013.

MURADAS, P.R; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; Avanço na avaliação espermática de equinos (revisão). **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 299-313, 2013.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

OLLERO M, BESCÓS O, CEBRIÁN-PÉREZ JA, MUIÑO-BLANCO T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriogenology**, v.49, p.547-55, 1998.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B; M. M.; CELEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013a.

PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procederes on sperm Membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

RÊGO J.P.A. Proteínas do plasma seminal e das células espermáticas de touros *Bos indicus* das raças brahman e guzerá associadas com os parâmetros seminais. 2014. 248 f. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

RODRÍGUEZ C.M.; DAY J.R.; KILLIAN G.J. Osteopontin Gene Expression in the Holstein Bull Reproductive Tract. **Journal of Andrology**, Hoboken, v. 21, p. 414-421, 2000.

ROMERO A.; ROMAO M. J.; VARELA P.F.; KOLLN I.; DIAS J.M.; CARVALHO A.L.; SANZ L.; TOPFER-PETERSEN E.; CALVETE, J.J. The crystal structures of two spermadesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural & Molecular Biology**, Boston, v. 4, p. 783-788, 1997.

RONCOLETTA, M.; MORANI. E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H. 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull semen freezability. **Theriogenology**, v. 57, p. 479, 2002.

ROSA, EVERTON LUÍS SANTOS DA. Análise morfológica e proteômica da captação de nanopartículas de dióxido de titânio por neutrófilos humanos in vitro. 2012. 219 f., il. **Tese (Doutorado em Patologia Molecular)**—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SCHÖNECK C.; BRAUN J.; EINSPANIER R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, p. 633-642, 1996.

SOUZA, C.E.A. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim Reprod Sci**, v. 105, p. 72-89, 2008.

SOUZA, C.E.A.; REGO, J.P.; LOBO, C.H.; OLIVEIRA, J.T.; NOGUEIRA, F.C.; DOMONT, G.B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F.C.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, J.R.; MOURA, A.A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **J Proteomics**, 75:4436-4456, 2012.

SOUSA S.D. Proteômica do fluido da Rete Testis de carneiros Morada Nova. 2015. 133 f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Fortaleza-CE, 2015.

SUAREZ, S.S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell Tissue Res**, 363:185-194, 2016.

SULLIVAN, J.J., TURNER, p.C.; SELF, L.C., et al. **Survey of reproductive efficiency in the quarter horse and thoroughbred**. J Reprod Fertil, Supl.23, p.315-318, 1975.

SHIVAJI S.; SCHEIT K.H.; BHARGAVA P.J. Proteins of seminal plasma. New York, **John Wiley and Sons, Inc.**, 1990.

SQUIRES, E.L. et al. **Cooled and frozen Stallion Semen**. Fort Collins: Colorado State University.. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin, N. 9, p. 80, 1999.

STABENFELDT G.H.; EDQVIST L. Processos reprodutivos no macho. In: SWENSON M.J.; REECE, W.O. Dukes – **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A., 1996. Cap. 35, p. 603 – 614.

TERRACIANO, P. B. et al. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. Artigo dissertação de mestrado. **Revista Ciência Rural** – Universidade Estadual de Santa Maria, 2008.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induces cholesterol efflux from epididimal sperm. **Biol Reprod**, v.58, p.768-776, 1998.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biol Reprod**, v. 61, p. 590-598, 1999.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and limination. **Anim Reprod Sci**. v.89,p. 86-171, 2005.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.115-136, 2005.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: FINN CA, ed. **Oxford reviews of Reproduction Biology**. New York: Oxford University, v. 1, p. 283-330, 1979.

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

## 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

### Artigo 1

#### **Purificação de fração enriquecida de Binder of Sperm Protein 1 (BSP 1) do fluido seminal bovino através da técnica de precipitação por sulfato de amônio**

*Purification of enriched fraction of Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) from bovine seminal fluid by ammonium sulphate precipitation technique*

**A.R. Viana<sup>1</sup>, K.S. Otávio<sup>2</sup>, A.A. Moura<sup>2</sup>, G.F. Carneiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, SN – Boa Vista – Garanhuns – PE, CEP 55.296-901; <sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia animal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Autora para correspondência: [andrezarviana@hotmail.com](mailto:andrezarviana@hotmail.com)

#### **Resumo**

O fluido seminal obtido das glândulas vesiculares de touros tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas devido a sua importância para a fisiologia espermática de bovinos. Esses estudos nos fornecem informações sobre os mecanismos de atuação de proteínas associadas à membrana espermática no momento da ejaculação. Objetivou-se no presente estudo realizar purificação parcial da proteína Binder of Sperm 1 (BSP1), proteína de 15 kDa presente no fluidos das glândulas vesiculares de bovinos, por meio de precipitação com sulfato de amônio. O fluido seminal foi extraído das glândulas vesiculares obtidas de dez touros *Bos indicus* em abatedouro comercial de Fortaleza, Ceará. As glândulas foram transportadas em recipiente refrigerado e foram processadas no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará. Após a extração do fluido, foi utilizado um coquetel inibidor de proteases, adicionado na proporção 1:1000 e posteriormente submetido a centrifugação (700 x g, 4°C, 15 min). O

sobrenadante foi pipetado e novamente centrifugado (5000 x g, 4°C, 60 min). Um pool de todas as amostras foi armazenado a – 20 °C e uma alíquota foi reservada para determinar a concentração de proteína. Para a precipitação de proteínas, foram adicionadas diferentes concentrações de sulfato de amônio, em seguidas dessalinizadas por meio de diálise, realizando oito trocas de água destilada a cada 1h. As amostras foram liofilizadas a – 50° C em pressão mínima de 0,035 mBar e depois ressuspendidas em solução tampão de Tris-HCl 0,1 M e pH 7,6. Para acompanhar o processo de purificação da fração enriquecida, foram realizados SDS-PAGE e Western blot com anticorpo específico confirmando a presença de BSP1. Foi observada presença da proteína em todas as frações, porém, a fração 40-60% foi a que apresentou a maior concentração de BSP1, em média 98%. A técnica utilizada foi altamente eficaz e a purificação dessas proteínas possibilita uma aquisição de uma matéria prima a ser testada para melhoria qualidade seminal *in vitro*, assim como avaliar o potencial de fertilidade de reprodutores.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*, proteína, plasma seminal, sulfo de amônio

### Abstract

Seminal fluid obtained from vesicular glands of bulls has been subject of several studies due to its importance in the spermatoc physiology of bovine. These studies provide information on mechanisms of action associated with sperm membrane proteins at the time of ejaculation. The objective of the present study was to perform partial purification of protein Binder of SPerm 1 (BSP1), a 15 kDa protein present in the vesicular gland fluids of bulls, through precipitation with an ammonium sulfate technique. Seminal fluid was extracted from vesicular glands obtained of ten *Bos indicus* bulls in a commercial slaughterhouse in Fortaleza, Ceará. Glands were transported in refrigerated container and were processed at the laboratory of Animal Physiology at the Federal University of Ceará. After fluid extraction, a protease inhibitor cocktail was used, added in the proportion 1:1000 and subsequently subjected to centrifugation (700 x g, 4 C, 15 min). Supernatant was pipetted and centrifuged again (5000 x g, 4 C, 60 min). A pool of all samples was stored at -20° C and a portion was reserved to determine protein concentration. For protein precipitation, different

concentrations of ammonium sulfate were added, followed by unsalt steps through dialysis, making eight changes of distilled water every hour. Samples were freeze dried to  $-50^{\circ}\text{C}$  in a minimum pressure of 0.035 mBar and then, resuspended in Tris-HCl buffer, pH 7.6 0.1 M. To monitor purification process, SDS-PAGE and Western blot was performed to confirm the presence of BSP1. Protein presence was observed in all fractions, however, 40-60% fraction was presented at the highest concentration of BSP1 (98%). The technique used was highly effective and purification of these proteins enables acquisition of a rich material to be tested for seminal quality improvement in vitro, as well as evaluating the fertility potential of sires.

Keywords: *Bos indicus*, protein, seminal plasma, ammonium sulfo

### Introdução

O plasma seminal (PS) exerce diversas funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação (ELZANATY, 2002; TROEDSSON et al., 2005). Considerando a função do PS, a análise dos fluidos reprodutivos fornece informações cruciais para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos (MOURA et al., 2011).

O fluido da vesícula seminal contém proteínas que participam de eventos relacionados à proteção dos espermatozoides (KRAUS et al., 2005) durante o trânsito epididimário e o armazenamento na cauda do órgão, como também no momento da ejaculação e no trato reprodutor da fêmea (HINTON et al., 1995).

Algumas proteínas presentes no PS modulam eventos de ligação à membrana espermática e servem como marcadores moleculares para diferentes mecanismos de fertilização (CHACUR et al., 2003).

Dentre essas moléculas, a *bindin of sperm* (BSP) trata-se de uma família de proteínas presentes no PS de diferentes espécies. São produzidas nas vesículas seminais de touro (MANJUNATH et al., 1987), garanhão e cachaco (CALVETE et al., 1997), bode (VILLEMURE et al., 2003) búfalo (ARANGASAMY et al., 2005), carneiro (BERGERON et al., 2005), e no epidídimo de ratos (LEBLOND et al., 1993) e humanos (LEFRIEVE et al., 2007).

As proteínas BSPs compreendem a maior parte do plasma seminal bovino (KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007), originando principalmente das glândulas sexuais acessórias (MANJUNATH et al., 2009).

O processo de purificação das proteínas tem como principal objetivo a obtenção de uma amostra pura para melhor compreensão de suas características estruturais e bioquímicas, além de um produto com maior atividade específica para aplicação em diversos processos (KOBLOITZ et al., 2004). Essas metodologias utilizadas, tais como centrifugação, diálise e cromatografias são realizadas em sequência de modo a obter uma amostra mais purificada possível (MORAES et al., 2013).

A solubilidade de uma proteína pode variar de acordo com a concentração de sal a qual ela é submetida. A precipitação por sulfato de amônio é um método usado para purificar proteínas alterando sua solubilidade, através da técnica conhecida como *salting out*. O sulfato de amônio é comumente usado porque sua solubilidade é tão alta que são permitidas soluções salinas com elevada força iônica (MORAES et al., 2013).

A solubilidade das proteínas pode variar de acordo com a força iônica da solução e, portanto, de acordo com a concentração de sal (MORAES et al., 2013). O sal comumente utilizado é o sulfato de amônio, e por ser muito solúvel em água, é geralmente utilizado como uma solução aquosa saturada que é diluída até que atinja concentração necessária, expressa como uma concentração percentual da solução saturada (uma solução a 100%) (JUMP, 2013).

A concentração de sulfato de amônio é aumentada passo a passo, e a proteína precipitada é recuperada em cada estágio. Esse processo geralmente é feito pela adição de sulfato de amônio sólido, com objetivo de encontrar a concentração de sulfato de amônio que irá precipitar a proporção máxima de proteína desejada. Esta técnica é útil para remover rapidamente grandes quantidades de proteínas contaminantes, como primeiro passo em muitos esquemas de purificação. É também frequentemente utilizado durante os últimos estágios de purificação para concentrar a proteína a partir da solução diluída seguindo procedimentos tais como a diálise (JUMP, 2013).

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de purificar o Binder do SPerm Protein 1 (BSP1), uma proteína de 15 kDa presente no líquido da vesícula seminal de touros *Bos indicus*, através da precipitação por sulfato de amônio.

## Material e Métodos

### Coleta e processamento do fluido seminal bovino

O fluido seminal foi obtido de glândulas vesiculares colhidas de dez touros *Bos indicus* em um abatedouro comercial da região metropolitana de Fortaleza, Ceará, Brasil. As glândulas foram transportadas em recipiente refrigerado para o Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

Após dissecadas, uma incisão longitudinal de 2 cm foi feita em cada glândula com o auxílio de um bisturi. Em seguida, as glândulas foram gentilmente massageadas na incisão para extração do fluido, que foi armazenado em tubos Falcon de 15 mL.

Imediatamente após a extração, um coquetel de inibidor de protease (Sigma Aldrich, USA) foi adicionado na proporção 1:1000 ao fluido das glândulas vesiculares e, em seguida centrifugado (700 x g, 4°C, 15 min), para separação dos artefatos celulares do sobrenadante. O sobrenadante foi pipetado em tubos Falcon limpos de 15 mL e centrifugados novamente (5000 x g, 4°C, 60 min).

Então, foi realizado um pool de todas as amostras para uniformizar o conteúdo e foram feitas alíquotas de 1,0 ml, armazenando-as a -20°C. Uma alíquota foi utilizada para determinar a concentração de proteína seguindo metodologia descrita por Bradford (1976).

### Precipitação das proteínas do fluido seminal bovino com sulfato de amônio

Imediatamente após a extração, adicionou-se uma mistura de inibidores de proteases numa proporção de 1: 1000 no fluído e depois centrifugou-se (9000 x g, 4°C, 15 min) para separar os artefatos celulares do sobrenadante. Para precipitar as proteínas, foram adicionadas concentrações de sulfato de amônio de acordo com o volume da amostra. Essas frações foram ressuspensas (solução: tampão tris-HCl 0,1 M , pH 7,6), em seguida, foram então dessalinizadas por meio de diálise, no qual foram realizadas oito trocas de água em intervalo de uma hora cada, seguida de uma liofilização por 48h a -50°C e pressão mínima de 0,035 mBar. Para verificar o processo de purificação, foram realizados a Dodecil-sulfato de sódio-Eletroforese em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE) e Western blot com anticorpo específico para confirmar a presença de BSP1 na amostra.

### **Eletroforese unidimensional**

Amostras liofilizadas da fração enriquecida de BSP1 obtidas através de precipitação com sulfato de amônio, foram ressuspensas em 200 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M, e as proteínas quantificadas por meio do método de Bradford (1976). Para a eletroforese, foram utilizados 20 µg de proteínas do fluido das glândulas vesiculares (controle positivo), a fração enriquecida saturada em concentração 0 – 20% de sulfato de amônio, 20 – 40%, 40 – 60%, 60 – 80% e 80 – 100%, respectivamente, adicionados de tampão de corrida (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas por 90 segundos, e pipetadas nos poços do gel de concentração (4% de acrilamida), colocado sobre um gel de corrida de 12,5% de acrilamida. Para a corrida eletroforética foi utilizado o seguinte padrão da eletroforese (SE600 Ruby, GE Healthcare): 500V, 25mA/gel, 90W. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (CBBR250) “overnight” e descorado após lavagens com soluções contendo etanol (40%), ácido acético (10%) e água destilada (50%). Os géis foram digitalizados com o auxílio do ImageScanner (GE Healthcare, USA) a 300 dpi.

### **Western blot**

O fluido das glândulas vesiculares e as frações precipitadas foram avaliados através de Western Blot. Em resumo, 20 µg de proteínas totais do fluido das glândulas vesiculares, seguido das frações enriquecidas de BSP1, foram separados de acordo com seu peso molecular por meio de SDS-PAGE em gel de acrilamida (12,5%). Proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Hybond-P, GE Lifesciences, USA) utilizando uma unidade de transferência (TE 70, GE Lifesciences, USA). As membranas foram bloqueadas “overnight” à 4°C submersa em mistura de 30 ml de PBS-T (PBS + 0,5% de Tween20) e 5% de leite desnatado, seguidas de uma hora de incubação com anticorpo primário contra a BSP1 bovina (1:6000) cedido pelo Dr.

Puttaswamy Manjunath (Departamento de Medicina, Universidade de Montreal, Canadá). A membrana de PVDF foi lavada três vezes com PBS-T por dez minutos, seguida de 1h de incubação com anticorpo secundário (1:5.000 Dnk pAb to Rb IgG; Abcam or Donkey anti-rabbit) e então enxaguados três vezes com PBS-T por dez minutos. A imunorreação foi visualizada após a exposição da membrana ao substrato fosfatase alcalina BCIP/NBT (Sigma Aldrich, USA). A reação foi parada após lavar a membrana com água Mili-Q.

## **Resultados**

Nesse estudo foi possível se obter uma fração altamente purificada (em torno de 98%) e enriquecida de BSP1 a partir do fluido das vesículas seminais de touros, utilizando-se a técnica de precipitação por sulfato de amônio.

Por meio da análise do perfil proteico da BSP1, a SDS-PAGE demonstrou que esta proteína está presente em todas as frações. Porém, a fração 40-60% foi a que apresentou a maior concentração de BSP1, se comparado com as demais frações.

No entanto, ainda foi possível observar a presença, mesmo que em pequenas quantidades da BSP5 (figura 1).

## **Discussão**

Há fortes evidências de que as proteínas provenientes do PS modulam a função espermática. As relações entre algumas destas proteínas associadas a índices de fertilidade em determinadas espécies indicam que elas são potenciais marcadores moleculares da capacidade reprodutiva (MOURA et al., 2011).

As proteínas ligadoras de fosfolipídios denominadas de BSPs (Binder of Sperm Proteins) compreendem a maior parte do plasma seminal bovino (MOURA et al., 2007), além de encontrar-se presente em várias outras espécies tendo supostamente uma função vital nos mais diversos processos reprodutivos. Essas proteínas são compostas de peptídios de cadeia única apresentando dois domínios semelhantes à fibronectina tipo II, característica que lhes confere a capacidade de ligação a fosfolipídios (CALVETE et al., 1996). É sabido ainda que as BSPs ligam-se aos espermatozoides no momento da ejaculação, promovendo a remoção de fosfolipídios e colesterol (THERIEN et al., 1998;

1999), resultando na diminuição da proporção colesterol:fosfolipídio, um dos pré-requisitos à capacitação espermática. Além disso, estas proteínas tem uma função protetora à membrana espermática já que encontra-se intimamente ligada durante o trajeto no sistema genital feminino (SOUZA et al., 2008) e, ao atingirem o oviduto, auxiliam na ligação espermatozoide-epitélio ovidutal (GWATHMEY et al., 2006). As BSPs apresentam uma alta correlação com fertilidade de touros (seja *in vivo* ou *in vitro*) e estes estudos nos permite hipotetizar que as BSPs podem servir como proteínas adjuvantes na qualidade seminal, além de potenciais indicadores da reprodução dos machos.

### **Conclusões**

Com os resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que a técnica de precipitação por Sulfato de Amônio foi altamente eficaz para purificação da proteína BSP1, demonstrando assim que, esta técnica pode ser utilizada para obtenção de amostras altamente enriquecidas de BSPs.

Os setores responsáveis pela produção animal demandam maiores índices de produtividade. A purificação das proteínas demonstrada nesse estudo possibilita uma matéria prima profícua e pode servir como base para diferentes experimentos avaliando tanto a qualidade seminal quanto o seu efeito na qualidade espermática *in vitro*, assim como o potencial de fertilidade dos reprodutores.

### **Agradecimento**

A equipe do laboratório de Fisiologia Animal da UFC, Arabela Guedes, Denize Azevedo, Moêmia Portela, Kamila Otávio, Maria Julia Barbosa, e ao Professor Arlindo Moura por toda ajuda e acolhimento durante o período que passei em Fortaleza.

### Referências Bibliográficas

ARANGASAMY, A., SINGH, L.P., AHMED, N., ANSARI, M.R., RAM, G.C. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. **Anim Reprod Sci** 2005;90:243–54.

BERGERON, A., VILLEMURE, M., LAZURE, C., MANJUNATH P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Mol Reprod Dev** 2005;71:461–70.

BRADFORD, M. M.; *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.

CALVETE, J.J., MANN, K. SANZ, L. RAIDA, M., TOPFER-PETERSEN E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Lett**, v.399, p.147-152, 1996.

CALVETE, J.J., RAIDA, M., GENTZEL, M. URBANKE C., SANZ L., TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholinebinding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Lett** 1997;407:201–6.

CHACUR, M.G.M., RABESQUINE, M.M., PARRA, J.A.G, MACHADO NETO, N.B. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal, correlação com o quadro espermático. **Rev Bras Reprod Anim**, v.27, p.185-186, 2003.

ELZANATY, S. et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Hum Reprod.** v. 7, p. 2904-11, 2002.

GERENA RL, IRIKURA D, URADE Y, EGUCHI N, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biol Reprod.** v.58, p.826-833, 1998.

GWATHMEY TM, IGNOTZ GG, MUELLER JL, MANJUNATH P, SUAREZ SS. Bovine seminal plasma proteins PDC- 109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biol Reprod**, v.75, p.501- 507, 2006.

HINTON, B.T. et al. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, p. 731-745, 1995.

JUMP, U.P., Ammonium Sulfate Calculator. **EnCor Biotechnology Inc.** Retrieved 19 April, 2013.

KELLY V.C.; KUY S.; PALMER D.J.; XU Z.; DAVIS S.R.; COOPER G.J. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5826-5833, 2006.

KILLIAN G.J., CHAPMAN DA, CANCELancel AM, Gerena RL, Rodriquez CM, Day JR. Male factors affecting sperm fertility. **Rev Bras Reprod Anim**, v.23, p.83-85, 1999.

KOBLITZ M.G.B.; PASTORE M.G. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 287-292, 2004.

KRAUS M, TICHÁ M, ZELEZNÁ B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **J Reprod Immunol**, v.65, p.33-46, 2005.

LEBLOND, E., DESNOYERS, L., MANJUNATH, P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. **Mol Reprod Dev** 1993;34:443–9.

LEFIEVRE, L., BEDU-ADDO K., CONNER S.J., MACHADO-OLIVEIRA, G.S., CHEN, Y., KIRKMAN-BROWN, J.C. Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? **Reproduction** 2007;133:675–84.

MANJUNATHE P., SAIRAM, M.R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochem J** 1987; 241:685–92.

MANJUNATH, P. et al. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biol Reprod**, v. 80, p. 394-397, 2009.

MOURA, A.A., CHAPMAN, D.A., KOC H., KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.169-188, 2007.

MOURA, A.A., ANDRADE, C.R., SOUZA, C.E.A., REGO, J.P.A., MARTINS, J.A.M., OLIVEIRA, R.V., MENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.

MORAES C.S.; OLIVEIRA JUNIOR F.O.R.; MASSON G.; REBELLO K.M.; SANTOS L.O.; BASTOS N.F.P.; FARIA R.C.R. Métodos experimentais no estudo de proteínas. (**Série em biologia celular e molecular**). Rio de Janeiro: IOC., p. 84, 2013.

SOUZA, C.E.A., MOURA, A.A., MONACO, E., KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim Reprod Sci**, v.105, p.72-89, 2008.

THÉRIEN, I., MOREAU R., MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biol Reprod**, v.61, p.590-598, 1999.

THÉRIEN, I., MOREAU R., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induces cholesterol efflux from epididimal sperm. **Biol Reprod**, v.58, p.768-776, 1998.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and limination. **Anim Reprod Sci**. v.89,p. 86-171, 2005.

VILLEMURE, M. LAZURE, C., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reprod Biol Endocrinol** 2003;1:39.

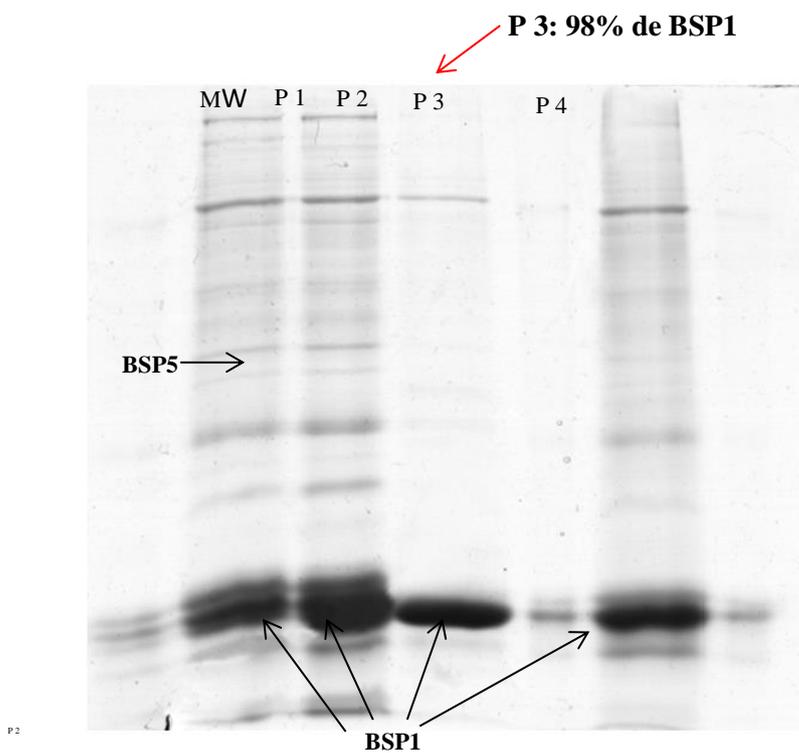


FIGURA 1- Frações de BSP1 bovino detectadas pelo Dodecil-sulfato de sódio-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em diferentes concentrações de Sulfato de Amônio. MW= Marcador; P1= Fração 0-20%; P2= Fração 20-40%; P3= Fração 40-60% e P4= sobrenadante. Fonte: Autor

## Artigo 2

*Uso de fração enriquecida de binder of sperm protein 1 de bovino na criopreservação de sêmen de garanhão*

Artigo a ser submetido a periódico científico.

Andreza Rodrigues Viana<sup>1\*</sup>, Gilvannya Gonçalves de Sobral<sup>1</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>, André Mariano Batista<sup>2</sup>, Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva<sup>2</sup>, Flávio Carneiro da Cunha Mergulhão<sup>2</sup>, Jurandyr Mauro Penitente Filho<sup>3</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, SN – Boa Vista – Garanhuns – PE, CEP 55.296-901; <sup>2</sup>Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil, <sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

\*e-mail: [andrezarviana@hotmail.com](mailto:andrezarviana@hotmail.com)

### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, avaliar a congelabilidade de semen de garanhão com diluidor acrescido de *Binder of Sperm Protein 1* (BSP1) de bovinos. Utilizou-se a proteína sintetizada de bovino, BSP1, que foi isolada no Laboratório do departamento de ciência animal da Universidade Federal do Ceará com a técnica de sulfato de amônio. Após isolamento e liofilização, testamos o efeito da adição dessa proteína em sêmen de garanhões nas concentrações de 0 (Controle), 10, 20 e 40 µg/mL ao diluente comercial (BOTUCRIO®), no sêmen de quatro garanhões da raça quarto de milha, totalizando cinco ejaculados por reprodutor. As amostras seminais foram avaliadas nos parâmetros de volume, motilidade total, progressiva, vigor e concentração espermática por microscopia de contraste de fase. Em seguida o sêmen foi centrifugado para retirada do plasma seminal a 1200g por 15 minutos, logo após foi acrescido a proteína BSP1, como descrito anteriormente e criopreservado com auxílio de máquina de congelção

programável de sêmen TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba – MG). Após a descongelação (37°C/30 segundos), as amostras foram submetidas à análise de cinética espermática através no CASA (no tempo 0 hora e TTR 1 hora). No tempo 0h apresentou diferença significativa no WOB nas concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL de BSP1, e na maior concentração (40 µg/mL) ( $P < 0.05$ ) para ALH e BCF. Após o TTR 1h, a concentração de 40 µg/mL continuou apresentando diferença significativa. A análise da função mitocondrial apresentou diferença significativa na concentração de 10 µg/mL da proteína, sendo inferior às demais concentrações e controle. Com relação a avaliação da IAC e IMP, a adição do BSP1 não provocou nenhuma alteração, indicando que mesmo se tratando de espécies heterólogas não houve dano à célula espermática do garanhão. Como o bovino apresenta uma alta fertilidade em relação ao garanhão, esses resultados além do ineditismo do trabalho, possibilitam maiores estudos utilizando-se proteínas de espécies heterólogas com o intuito de melhoria da qualidade seminal em garanhões. Foi possível observar também que esta proteína pode ter um efeito antioxidante com relação ao potencial mitocondrial da membrana plasmática do espermatozoide e efetivamente há uma alteração na cinética espermática que necessita de maiores estudos para compreender as consequências.

**Palavras chave:** Proteína, plasma seminal, bovino, sêmen, criopreservação.

## **ABSTRACT**

The aim with this work, was to evaluate the effect of Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) from seminal vesicle of bulls on semen quality of stallions, and watch your action in the congelability of this semen. The BSP1 protein was isolated at laboratory of Animal Science Department of Federal University of Ceará using the ammonium sulfate technique. After isolation and lyophilization, the effect of addition of BSP1 in semen of stallions was tested at concentrations of 0 (control), 10, 20 and 40 µg/mL added to a commercial extender (BOTUCRIO®), in semen from 4 quarter horse stallions, in a total of 5 ejaculates per stallion. Samples were evaluated in the seminal parameters of volume, total and progressive motility, sperm concentration using phase contrast microscopy. After evaluation, semen was centrifuged to remove seminal plasma 1200 g for 15 minutes, and then were added BSP1 protein, as described earlier and

cryopreserved using a semen programmable machine (TK 3000® - Freezing Technology LTDA, Uberaba-MG). After thawing (37° C / 30 seconds). Samples was submitted to sperm kinetics analysis at CASA (time 0 hour and TTR 1 hour). At time 0h there was a significant difference in WOB at concentrations of 20 µg / mL and 40 µg / mL BSP1, and at the highest concentration (40 µg / mL) (P <0.05) for HLA and BCF. After TTR 1h, the concentration of 40 µg / mL continued to present a significant difference. The analysis of mitochondrial function showed a significant difference in the concentration of 10 µg / mL of the protein, being lower than the other concentrations and control group, indicating a possible antioxidant action. Regarding the evaluation of IAC and IMP, the addition of BSP1 did not provoke any alteration, indicating that even when dealing with heterologous species there was no damage to the sperm cell of the stallion. As the bovine has a high fertility in relation to the stallion, these results, besides the novelty of the work, allow further studies using proteins of heterologous species with the purpose of improving seminal quality in stallions. It was also possible to observe that this protein may have an antioxidant effect with respect to the mitochondrial potential of the sperm plasma membrane and there was a significant change in sperm kinetics that requires further studies to understand the consequences.

Key words: Protein, seminal plasma, bovine, semen, cryopreservation.

## **INTRODUÇÃO**

A biotecnologia do sêmen proporciona diversas vantagens, como aumento da disponibilidade de espermatozoides, facilitando os trabalhos de reprodução assistida. Outras vantagens observadas é a otimização no uso de garanhões com comprovada superioridade genética, como também a possibilidade do armazenamento de sêmen, mesmo fora da estação de monta, além da quebra das barreiras geográficas, tornando possível o envio de sêmen para qualquer parte do mundo (BARRETO et al., 2008).

O desenvolvimento da biotecnologia de criopreservação tem apresentado grandes avanços na área de reprodução animal, tanto no melhoramento da qualidade quanto na fertilidade do sêmen após seu processamento (JOBIM, 2011).

Diversos estudos relataram efeitos benéficos da utilização do plasma seminal na criopreservação de diversas espécies tais como equinos (KATILA et al., 2002), bovinos (RONCOLETTA et al., 2002), humanos (BEM et al., 1997), suínos (METZ et al., 1990) e ovinos (GHAOUI et al., 2007). Aurich et al., (1996) relataram que espermatozoides de garanhões com baixa motilidade pós-descongelamento (<20%) apresentaram melhora quando foram criopreservados com PS de garanhões que produziam espermatozoides com alta motilidade pós-descongelamento.

O PS exerce diversas funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação, tais como: ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, capacitação espermática, entre outros (ELZANATY, 2002; TROEDSSON et al., 2005).

As proteínas presentes no PS desempenham um papel importante na estabilização dos espermatozoides, uma vez que conferem estabilidade à membrana plasmática e participam de processos como formação de reservatórios espermáticos e interação espermatozoide-oócito (JUYENA; STELLETTA, 2012). É sabido que o impacto da fertilidade do touro no desempenho reprodutivo dos rebanhos é fundamental e que esses animais são selecionados baseado na capacidade fertilizante. Em contrapartida na espécie equina a seleção dos reprodutores não é realizada baseada nas características reprodutivas, mas através de fatores fenotípicos e performance atlética (ALVARENGA et al, 2017).

As proteínas BSPs compreendem a maior parte do plasma seminal bovino (KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007). As proteínas que fazem parte dessa família possuem a capacidade de interagir com fosfolipídios, contendo colinas presentes na membrana dos espermatozoides no momento da ejaculação. Vale ressaltar que elas são capazes de se ligar ao LDL de forma rápida e saturável, e essa interação tem efeitos consideráveis na preservação da função espermática (BERGERON et al., 2004).

Essa família de proteínas está correlacionada com índices de fertilidade em touros, além de constituírem o principal grupo de proteínas do plasma seminal de ruminantes, onde apresentam-se como potenciais indicadores de fertilidade na reprodução de machos (MOURA et al., 2011).

Além de serem abundantes em ruminantes, os estudos realizados em touros confirmam que as BSPs têm amplo efeito no espermatozoide do ejaculado, incluindo capacitação, interação com o epitélio do oviduto e fertilização. O fato de as BSPs interagirem com componentes dos extensores de sêmen sugerem que essas proteínas são possíveis alvos para o desenvolvimento de novos marcadores de fertilidade e biomoléculas que podem melhorar as tecnologias de reprodução assistida (MOURA; MEMILI, 2016).

Segundo Moura et al., (2011), todas estas linhas de estudo pressupõem a hipótese de que os componentes moleculares dos espermatozoides, ou dos meios que os cercam, influenciam a capacidade fecundante de tais células, e as diferenças de fertilidade observadas entre os animais, não explicadas pelos testes de rotina para avaliação da qualidade do sêmen, relacionam-se com esses componentes.

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da proteína *BSP1* do plasma seminal bovino em sêmen de garanhão, observando se a adição da mesma poderá favorecer a elaboração de meios extensores com o objetivo de melhoria pós-descongelamento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os procedimentos, envolvendo animais foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE), sob licença n° 013/2019 CEUA/UFRPE.

O experimento foi desenvolvido no haras Monte Verde que encontra-se no município de Sairé - PE, à 6 km da BR 232, onde localiza-se a uma latitude 08°19'39''Sul, altitude de 663 metros, com população estimada de 11.242 habitantes, pertencente ao Agreste de Pernambuco. As amostras foram processadas no Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) e o Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

No estudo foi utilizada uma fração enriquecida de BSP 1, obtida do Departamento de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará, sendo adicionada nas concentrações de 0 (Controle), 10, 20 e 40 µg/mL ao diluente comercial

Botu-crio® (Biotech Botucatu, Botucatu- SP, Brasil) (gema de ovo, glicerol, metilformamida), no sêmen de quatro garanhões da raça quarto de milha.

### **Coleta de sêmen**

O sêmen dos garanhões da raça quarto de milha foram obtidos através de coleta com o emprego de vagina artificial modelo Botucatu, em copo coletor graduado, para medição do volume seminal, com filtro estéril para filtragem do sêmen e descarte da fração gel, preparada com água aquecida a 45°C; como manequim foi utilizada uma égua em estro, totalizando cinco ejaculados por reprodutor. Imediatamente após a colheita, o processamento dos ejaculados ocorreram de acordo com (MARTINS, L.T. et al., 2009).

### **Congelamento de sêmen**

O sêmen dos garanhões foram analisados no laboratório do haras Monte Verdes, visualmente, o volume, o aspecto e a cor e, sob microscopia convencional, a motilidade total e o vigor, segundo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA. Uma alíquota de 10µL de sêmen de cada ejaculado foi diluído em 1 mL de citrato de sódio formalizado, para determinação da concentração espermática, por meio a câmara de Neubauer (espermatozóide/mL) e realizou-se a análise morfológica, através da técnica da câmara úmida. Após avaliação, centrifugou-se o sêmen para retirada do plasma a 1200g por 15 minutos. Os ejaculados foram diluídos para congelamento, sendo acrescido nas concentrações de 0 (Controle), 10, 20 e 40 µg/mL ao diluente comercial Botu-crio®, e criopreservados com auxílio de máquina de congelação programável de sêmen nacional TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba – MG). Por fim, as amostras foram transportadas para o ANDROLAB da Universidade Federal Rural de Pernambuco para posteriores avaliações no tempo 0 hora e também pelo teste de termo resistência (TTR) com 1 hora, no CASA software Sperm Class Analyser (SCA® – Microoptics Barcelona, Espanha); integridade de membrana plasmática; integridade do acrossoma; função mitocondrial.

## **Descongelamento e avaliação *in vitro* dos espermatozoides**

As amostras de sêmen criopreservadas foram descongeladas (37°C por 30 segundos) após 30 dias de armazenamento em botijão de nitrogênio e submetidas à análises de cinética espermática, integridade de membrana e acrossoma, função mitocondrial.

### *Cinética espermática*

Para determinação da cinética espermática, uma palheta de cada grupo foi descongelada em banho-maria, na temperatura de 37°C, por 30 segundos. A análise foi realizada utilizando-se o sistema CASA. Onde uma alíquota (2,5 µL) de cada amostra foi colocada sobre lâmina, coberta por lamínula, pré-aquecida a 37°C, avaliada por microscopia de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japan) e as imagens foram captadas por uma câmara de vídeo (Basler Vision Technologies, A312FC, Ahrensburg, Germany).

As avaliações de motilidade espermática foram realizadas em cinco campos aleatórios e não consecutivos para cada amostra, pelo mesmo operador, analisando as seguintes variáveis: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; µm/s), velocidade em linha reta (VSL; µm/s), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), índice de oscilação (WOB; %); linearidade (LIN; %). As variáveis do sistema CASA foram mensuradas com as seguintes configurações: temperatura 37°C, magnificação (100x), imagens por segundo (25), área de cabeça (20 a 70 µm<sup>2</sup>), VAP (lentos 10 µm/s < médios 45 µm/s < rápidos 75 µm/s), progressividade (80% STR) e circular (50% LIN).

### *Integridade de membrana plasmática*

Para essa avaliação, as amostras foram coradas com o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) modificado por Coletto et al, 2002. Alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris

(3,605 g de Tris; 2,024 de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), contendo 5  $\mu$ L de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20  $\mu$ L de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos à 37°C e ficadas com PBS contendo 0,5 de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Cal Zeis, Gottingem, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de imersão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm, e classificado com membrana intacta, quando se apresentava corado em verde, e com membrana plasmática danificada, quando corado em vermelho.

### *Integridade acrossomal*

Para avaliação desse parâmetro, os espermatozoides foram corados com Isotiocianeto de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) de acordo com técnica descrita por Roth et al, (1998). Alíquotas de 5  $\mu$ L de sêmen foram preparadas para esfregaço e secadas ao ar. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900  $\mu$ L de PBS para obter a concentração final de 100  $\mu$ g/mL. Alíquotas (10-20  $\mu$ L) desta solução foram colocadas sobre lâminas, as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida à 4°C, na ausência de luz. Após a incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes por PBS refrigerado à 4°C e colocadas para secar na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5  $\mu$ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula.

Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x sob óleo de imersão em microscopia de epifluorescência, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides foram então classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossomas reagidos, quando apresentavam faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

### *Função mitocondrial*

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHERIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50  $\mu$ L de sêmen foram diluídas em 150  $\mu$ L de Tris contendo 5  $\mu$ L de JC-1 (0,5 mL em DMSO), incubadas por 10 minutos à 38°C e fixadas com PBS contendo 0,5% de Glutaraldeído. Duzentos espermatozoides foram avaliados em microscopia de epifluorescência, com aumento de 1000x sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células que apresentavam a peça intermediária corada em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto que aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana mitocondrial.

### **Avaliação da longevidade dos espermatozoides pós-descongelamento**

A longevidade dos espermatozoides pós-descongelamento foi avaliada pelo teste de termo resistência (TTR), que consistiu no acondicionamento de 1,0mL da amostra de sêmen em tubos plásticos de 1,5mL em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Foram realizadas avaliações de cinética espermática através do CASA, sendo as leituras realizadas nos tempos 0 e 60 minutos de incubação.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores de percentagem foram submetidos à transformação angular ( $Y' = \arcseno(\sqrt{Y})$ ) e analisados de acordo com o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + G_j + [(ES)]_{ij} + C_{jk} + e_{ijk}$$

Em que:  $Y_{ijk}$ , resposta;  $\mu$ , constante;  $T_i$ , efeito do tratamento;  $G_j$ , efeito do ganhão;  $[(TG)]_{ij}$ , interação;  $C_{jk}$ , efeito da coleta, assumido  $N(0, \sigma_C^2)$ ;  $e_{ijk}$ , erro, assumido  $N(0, \sigma^2)$ ;  $C_{jk}$  e  $e_{ijk}$  foram assumidos serem independentes.

Para clareza, os resultados dos dados transformados foram apresentados em percentagem. As médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS

Foram avaliados os parâmetros cinéticos no tempo “0” e com 1 hora de incubação (TTR). Os resultados relacionados à velocidade espermática (ALH, BCF, WOB,) dos espermatozoides após a criopreservação diferiram estatisticamente nas análises tanto no tempo 0h como no TTR 1h. A adição de BSP1 nas concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL aumentaram ( $P < 0,05$ ) os índices de oscilação (WOB) no tempo “0”, e este efeito se manteve aumentado no TTR na maior concentração (40 µg/mL). Enquanto que houve uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) para os índices de amplitude de deslocamento da cabeça (ALH) e na Frequência de Batimento Flagelar Cruzado (BCF) (tabela 1) na concentração de 40 µg/mL em ambos tempos avaliados (tabela 2).

As motilidades total e progressiva não apresentaram alterações significativas ( $P < 0.05$ ) após a adição da BSP1 nas diferentes concentrações.

Os resultados referentes à potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides após a descongelação, foram inferiores ( $P < 0.05$ ) na concentração de 10 µg/mL, o qual foi inferior às demais concentrações e controle (tabela 3).

Com relação aos resultados relacionados à IAC e IMP não apresentaram diferença significativa independente da concentração do BSP1 adicionado (tabela 3).

## DISCUSSÃO

Uma de nossas expectativas era com relação a um possível efeito de hiperativação espermática do BSP1 visto que há relatos de um amplo efeito no espermatozoide do ejaculado, incluindo capacitação, interação com o epitélio do oviduto e fertilização (MOURA; MEMILI, 2016). Sabe-se ainda que a hiperativação é um fenômeno caracterizado por um aumento no ALH e no BCF possivelmente por um aumento do influxo de cálcio (MARQUEZ et al, 2007). Nossos resultados indicaram exatamente o inverso havendo uma redução significativa nesses dois parâmetros detectados pelo sistema CASA. Enquanto que houve um aumento no WOB que é um dos indicativos de hiperativação. Esses dados diferem dos dados publicados em bovinos e demais espécies (MARQUEZ et al, 2007). Levando-nos a crer que na espécie equina possivelmente a proteína BSP1 age modulando esse influxo de cálcio, portanto

necessitando maiores estudos avaliando-se as concentrações intracelulares de cálcio a partir da adição dessa proteína.

Os resultados relacionados a IAC e IMP demonstram que após a adição de BSP 1 não provocou nenhuma alteração ou dano, embora existam diferenças consideráveis na composição da membrana plasmática entre as espécies de mamíferos (FLESH, F.M. e GADELLA, B.M., 2000). A adição de uma proteína de uma espécie heteróloga não provocou nenhum dano a célula espermática do garanhão.

A necessidade de organismos aeróbicos utilizarem a respiração é consequência da demanda de oxigênio para a mitocôndria que por meio da fosforilação oxidativa produz grande parte (90%) da energia celular, na forma de ATP onde a energia é armazenada para posterior utilização. Durante essa ação da mitocôndria no metabolismo celular ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Eventuais desequilíbrios entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes caracterizam o estresse oxidativo, que pode afetar diretamente as células espermáticas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estudos vêm demonstrando correlações negativas tanto entre o estresse oxidativo e a integridade de DNA quanto com a alta atividade mitocondrial, o que indica que tais variáveis estão interligadas, formando possivelmente um mecanismo patogênico único (BLUMER et al., 2012). Nesse estudo foi observado ( $P < 0,05$ ) no PMM na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , o qual foi inferior às demais concentrações e grupo controle (tabela 3). O funcionamento mitocondrial de maneira ordenada e aprimorada é fundamental para os espermatozoides de mamíferos, sendo altamente relacionado com altas taxas de funcionalidade da célula espermática. O efeito observado após a adição da BSP1 na concentração 10  $\mu\text{g/mL}$ , pode sugerir uma ação antioxidante e possivelmente favorável na melhoria da qualidade seminal pós criopreservação e consequentemente em uma melhor seleção de animais de interesse reprodutivo.

## **CONCLUSÃO**

Como o touro apresenta alta fertilidade comparado ao garanhão, em virtude da seleção genética dessa espécie está voltada para eficiência reprodutiva, foi possível observar que a BSP1 não provoca dano à célula espermática mesmo sendo de uma espécie heteróloga.

Em virtude do ineditismo dessa pesquisa utilizando-se proteínas de espécies heterólogas, a importância do presente trabalho é evidente e abre perspectivas para futuros estudos com o intuito da melhoria da qualidade seminal pós descongelamento de espermatozoides na espécie equina.

Foi possível observar também que esta proteína pode ter um efeito antioxidante com relação ao potencial mitocondrial da membrana plasmática do espermatozoide e efetivamente há uma alteração na cinética espermática que necessita-se de maiores estudos para compreender quais as consequências.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v. 46, p. 791-797.1996.

ALVARENGA, M.A., PAPA F.O., RAMIRES NETO, C. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.81-85, jan./mar. 2017.

ARRUDA R.P.; Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 121f. **Tese (Livre Docência)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A.. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BEN, W.X. et al. Effect of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. **Archives of Andrology**, v. 39, p. 211-216, 1997.

BERGERON A.; CRÊTE M.H.; BRINDLE Y.; MANJUNATH P. Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**. v.70, p.708-717, 2004.

BLUMER CG, RESTELLI AE, GIUDICE PTD, SOLER TB, FRAIETTA R, NICHI M, BERTOLLA RP, Cedenho AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **BJU Int**, v.109, p.259-265, 2012.

COLETO, Z.F.; GERRA M.M.P.; BATISTA, A.M.; Avaliação do semen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

ELZANATY, S. et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Hum Reprod**. v. 7, p. 2904-11, 2002.

FLESH FM, GADELLA BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys*, v.1469, p.197-235, 2000.

GHAOUI, R.E. et al. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v. 42, p. 541–549, 2007.

GWATHMEY TM, IGNOTZ GG, MUELLER JL, MANJUNATH P, SUAREZ SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biol Reprod**, 75:501-507, 2006.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: **Oxford University Press**, p. 936, 1999.

JOBIM, M.I.M. et al. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, n.6, p. 25-31, dez. 2009.

JOBIM, M.I.M. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino. 2001. 156f. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

JOHNSON, L.A., MAXUEL, W.M.C., BRISKY, J.R. Staining sperm or viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals**., v. 31, n. 1, p. 37-45, 1996.

JUYENA N.S.; STELLETTA C. Seminal Plasma : An Essential Attribute to Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p.536–551, 2012.

KATILA, T.; et al. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 58, p. 241-244, 2002.

KELLY V.C.; KUY S.; PALMER D.J.; XU Z.; DAVIS S.R.; COOPER G.J. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5826-5833, 2006.

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

MARQUEZ, B.; IGNOTZ, G.; SUAREZ, S.S. Contributions of extracellular and intracellular Ca<sup>2+</sup> to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. **Developmental Biology**, v. 303, P. 101- 132, 2007.

MARTINEZ-PASTOR F, JOHANNISSON A, GIL J, KAABI M, ANEL L, PAZ P, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram sêmen. **Anim Reprod Sci**, v.84, p.121-133, 2004.

METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 34, p. 691-700, 1990.

MOURA, A.A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Anim Reprod**, v. 2, p. 3-10, 2005.

MOURA, A.A. et al. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J Androl**, v. 27, p. 201-211, 2006a.

MOURA A. A.; HASAN K.; CHAPMAN DAVID A.; GARY J.K. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006b.

MOURA A.A.; CHAPMAN D.A.; KOC H.; KILLIAN G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, 2007.

MOURA, A.A. et al.. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **J Proteomics**, v. 73, p. 2006-20, 2010.

MOURA, A.A. et al. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.

MOURA, A.A.A., MEMILI, E., Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. **Anim. Reprod.**, v.13, n.3, p.xxx-xxx, Jul./Sept. 2016.

RONCOLETTA, M.; MORANI. E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H. 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull semen freezability. **Theriogenology**, v. 57, p. 479, 2002.

ROTH, T.L. et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 475-482, 1998.

RÊGO J.P.A. Proteínas do plasma seminal e das células espermáticas de touros *Bos indicus* das raças brahman e guzerá associadas com os parâmetros seminais. 2014. 248 f. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

SOUZA, C.E.A. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim Reprod Sci**, v. 105, p. 72-89, 2008.

SUAREZ, S.S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell Tissue Res**, 363:185-194, 2016.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and limination. **Anim Reprod Sci**. v.89,p. 86-171, 2005.

VARNER DD. Developments in stallion sêmen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p.448-462, 2008.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assissted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

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

**Tabela 1** - Cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino criopreservado no tempo 0h, nos diferentes tratamentos com fração enriquecida com BSP1.

Variável	Tratamentos			
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL
MT (%)	67,41 ± 2,35 <sup>a</sup>	63,88 ± 2,70 <sup>a</sup>	63,38 ± 3,20 <sup>a</sup>	61,30 ± 2,77 <sup>a</sup>
MP (%)	41,15 ± 2,51 <sup>a</sup>	39,12 ± 2,51 <sup>a</sup>	40,25 ± 2,97 <sup>a</sup>	37,07 ± 2,49 <sup>a</sup>
VAP (µm/s)	60,33 ± 1,64 <sup>a</sup>	63,32 ± 2,26 <sup>a</sup>	63,75 ± 2,25 <sup>a</sup>	63,85 ± 1,80 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	52,01 ± 1,24 <sup>a</sup>	53,83 ± 1,69 <sup>a</sup>	54,48 ± 1,77 <sup>a</sup>	54,49 ± 1,36 <sup>a</sup>
VCL(µm/s)	75,76 ± 2,48 <sup>a</sup>	79,26 ± 3,04 <sup>a</sup>	78,51 ± 3,14 <sup>a</sup>	77,69 ± 2,63 <sup>a</sup>
ALH (µm)	2,53 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,06 <sup>ab</sup>	2,51 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,07 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	11,12 ± 0,29 <sup>a</sup>	10,70 ± 0,29 <sup>ab</sup>	10,77 ± 0,28 <sup>a</sup>	10,24 ± 0,27 <sup>b</sup>
STR (%)	86,43 ± 0,72 <sup>a</sup>	85,31 ± 0,92 <sup>a</sup>	85,63 ± 0,69 <sup>a</sup>	85,35 ± 0,88 <sup>a</sup>
WOB (%)	79,95 ± 0,90 <sup>b</sup>	81,33 ± 0,86 <sup>ab</sup>	81,51 ± 0,94 <sup>a</sup>	82,55 ± 0,80 <sup>a</sup>
LIN (%)	69,18 ± 1,20 <sup>a</sup>	69,45 ± 1,27 <sup>a</sup>	69,89 ± 1,27 <sup>a</sup>	70,73 ± 1,33 <sup>a</sup>

MT- Motilidade total; MP- Motilidade progressiva; VAP- Velocidade média da trajetória; VSL- Velocidade linear progressiva; VCL- Velocidade curvilínea; ALH- Amplitude deslocamento de cabeça; BCF- Frequência de batimento flagelar cruzado; STR- Retilinearidade; WOB- Índice de oscilação; LIN- Linearidade;

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ( $P < 0.05$ )

**Tabela 2** - Cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino criopreservado no TTR 1h, nos diferentes tratamentos com fração enriquecida com BSP1.

Variável	Tratamentos			
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL
MT (%)	58,49 ± 3,24 <sup>a</sup>	55,64 ± 3,03 <sup>a</sup>	56,48 ± 3,17 <sup>a</sup>	55,53 ± 3,55 <sup>a</sup>
MP (%)	32,97 ± 2,76 <sup>a</sup>	32,05 ± 3,04 <sup>a</sup>	31,14 ± 2,95 <sup>a</sup>	31,62 ± 2,82 <sup>a</sup>
VAP (µm/s)	58,20 ± 2,09 <sup>a</sup>	57,33 ± 2,24 <sup>a</sup>	57,80 ± 2,03 <sup>a</sup>	57,99 ± 1,86 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	49,58 ± 1,71 <sup>a</sup>	48,92 ± 1,86 <sup>a</sup>	48,85 ± 1,70 <sup>a</sup>	49,31 ± 1,54 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	71,16 ± 2,48 <sup>a</sup>	69,50 ± 2,65 <sup>a</sup>	69,75 ± 2,70 <sup>a</sup>	68,35 ± 2,50 <sup>a</sup>
ALH (µm)	2,39 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,09 <sup>ab</sup>	2,15 ± 0,09 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	10,23 ± 0,26 <sup>a</sup>	9,88 ± 0,20 <sup>a</sup>	9,87 ± 0,20 <sup>a</sup>	9,29 ± 0,23 <sup>b</sup>
STR (%)	85,22 ± 0,74 <sup>a</sup>	85,49 ± 0,92 <sup>a</sup>	84,73 ± 1,30 <sup>a</sup>	85,21 ± 0,96 <sup>a</sup>
WOB (%)	82,33 ± 0,99 <sup>a</sup>	82,28 ± 1,02 <sup>b</sup>	83,30 ± 1,06 <sup>ab</sup>	85,15 ± 0,70 <sup>a</sup>
LIN (%)	70,29 ± 1,20 <sup>a</sup>	70,66 ± 1,36 <sup>a</sup>	70,79 ± 1,83 <sup>a</sup>	72,62 ± 1,22 <sup>a</sup>

MT- Motilidade total; MP- Motilidade progressiva; VAP- Velocidade média da trajetória; VSL- Velocidade linear progressiva; VCL- Velocidade curvilínea; ALH- Amplitude deslocamento de cabeça; BCF- Frequência de batimento flagelar cruzado; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade;

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 3** - Os resultados das análises pós-descongelamento referentes a integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Variável	Tratamentos			
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL
IMP (%)	41,80 ± 1,12 <sup>a</sup>	39,78 ± 1,39 <sup>a</sup>	38,95 ± 1,40 <sup>a</sup>	38,83 ± 1,51 <sup>a</sup>
PMM (%)	49,95 ± 5,87 <sup>a</sup>	36,85 ± 4,93 <sup>b</sup>	45,85 ± 5,12 <sup>ab</sup>	49,05 ± 4,96 <sup>a</sup>
IAC (%)	75,28 ± 2,72 <sup>a</sup>	69,35 ± 3,37 <sup>a</sup>	70,50 ± 4,77 <sup>a</sup>	73,45 ± 3,02 <sup>a</sup>

IMP - Integridade de membrana plasmática; PMM - Potencial de membrana mitocondrial; IAC - Integridade de acrossoma. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ( $P < 0.05$ ).

## ANEXO – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1



RBRA &lt;rbra@cbra.org.br&gt;

Seg, 08/04/2019 08:40

Você ▾



Prezado(a) Autor(a). Andreza Viana,

Recebemos o manuscrito “**Purificação de fração enriquecida de Binder of Sperm Protein 1 (BSP 1) do fluido seminal bovino através da técnica de precipitação por sulfato de amônio – RB814**”, submetido à Revista Brasileira de Reprodução Animal. O trabalho será enviado para a análise do Corpo Editorial e faremos contato tão logo tenhamos uma posição sobre a situação corrente do mesmo.

Atenciosamente,

Secretaria das Publicações/RBRA/

---

**De:** Andreza Viana [mailto:andrezarviana@hotmail.com]**Enviada em:** sexta-feira, 5 de abril de 2019 15:32**Para:** rbra@cbra.org.br**Assunto:** Submissão artigo: Purificação de fração enriquecida de Binder of Sperm Protein 1 (BSP 1) do fluido seminal bovino através da técnica de precipitação por sulfato de amônio