

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 12/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS
EXPLANTES DA TUBA UTERINA**

LUCAS EMANUEL FERREIRA CANUTO

Botucatu, São Paulo

Março de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS
EXPLANTES DA TUBA UTERINA**

LUCAS EMANUEL FERREIRA CANUTO

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu, São Paulo
Março de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Canuto, Lucas Emanuel Ferreira.

Efeito do plasma seminal sobre a ligação de espermatozoides da cauda do epidídimo equino aos explantes da tuba uterina / Lucas Emanuel Ferreira Canuto. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504037

1. Equino - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Cinética. 4. Tubas uterinas. 5. Espermatozoides. 6. Epidídimo.

Palavras-chave: Cinética espermática; Garanhão; Teste de ligação.

Nome do Autor: Lucas Emanuel Ferreira Canuto

Título: EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS EXPLANTES DA TUBA UTERINA

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Haras Lub Breeding

Data da defesa: 12 de Março de 2019

Agradecimentos

A Deus, por ter colocado pessoas tão especiais e importante no meu caminho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Alagoas, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedido durante o projeto de pesquisa, e a Botupharma pela doação de materiais para execução da pesquisa.

Aos meus pais, Josué Canuto e Josefa Ferreira, e minhas irmãs Bárbara e Débora, pelo total apoio e amor incondicional.

Ao meu orientador professor Frederico Ozanam Papa, pela amizade e ensinamentos preciosos desde a residência, grande exemplo de dedicação e profissionalismo, por ter confiado em minha capacidade profissional e minhas ideias durante esse experimento.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Edilson, Edvaldo, Felipe, e Dona Raquel, pelos bons momentos de convívio e pela ajuda.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo grande apoio, amizade, ensinamentos e conselhos ao longo dos últimos anos.

Ao Professor Gabriel Monteiro da UFMG pelas diversas conversas e ajudas na idealização da pesquisa.

Ao Zezé Cruz por ter oferecido os animais para o experimento.

Ao frigorífico Frigonobre e aos funcionários que tornaram possível a coleta das tubas uterinas.

Aos Pós-graduandos Viviana Vallejo e Pablo Colômbia, que além de trocarem conhecimentos ajudaram de forma ativa nos testes de ligação da tuba uterina.

Aos Pós-graduandos da Cirurgia de Grandes animais, em especial Gabriel e Juliana por terem feito a parceria e castração dos animais.

A minha família de Botucatu, importantes em todos os momentos: Edjalma, Fernando, Humberto, Zero, Lucas Ceará, Arthur, David, Thaís, Verônica, Lucas Troncarelli, Sidney, Lorenzo, Rafael, Bruna, Luiza, Viviane, Felipe, Matheus, Hudson, Fábio.

A todos os Pós-Graduandos do Ceran pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos, amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esse período.

Aos residentes, Bruna, Matheus, Débora, Eduardo, Lucas, Mariana, Amanda, Letícia, Gabriela, pela ajuda e troca de conhecimento durante esse ano.

Aos inúmeros estagiários que sempre ajudaram e trocaram conhecimentos e experiências.

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na elaboração e desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Composição do ejaculado equino.....	3
2. Anatomia e fisiologia do epidídimo	4
3. Efeitos do plasma seminal sobre a viabilidade dos espermatozoides	4
4. Efeito do plasma seminal sobre a criopreservação do sêmen	5
5. Tuba uterina e o reservatório espermático	8
6. Efeito do PS sobre a ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina	10
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2.....	18
ARTIGO	19
Resumo	19
1. Introdução	20
2. Materiais e métodos	22
2.1. <i>Animais e local da pesquisa</i>	22
2.2. <i>Orquiectomia</i>	22
2.3. <i>Delineamento experimental</i>	23
2.4. <i>Processamento das amostras</i>	23
2.4.1. <i>Epidídimo</i>	23
2.4.2. <i>Plasma seminal</i>	24
2.4.3. <i>Colheita e cultura de células da tuba uterina</i>	24
2.5. <i>Avaliação espermática</i>	25
2.5.1. <i>Cinética espermática</i>	25
2.5.2. <i>Análise da integridade de membrana plasmática</i>	25
2.6. <i>Teste in vitro de ligação dos espermatozoides aos explantes</i>	26
2.7. <i>Análise Estatística</i>	26
3. Resultados	27
4. Discussão	28
5. Conclusão	31
6. Referências	32

CANUTO, L.E.F. EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS EXPLANTES DA TUBA UTERINA. Botucatu – SP. 2019. 42p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

RESUMO

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é uma das principais alternativas nos casos de óbito inesperado, eutanásia, processos obstrutivos ou castração terapêutica. Nessa técnica os espermatozoides não entram em contato com o plasma seminal, não incorporando seus constituintes, que interferem nos processos fisiológicos importantes para fertilização, como a ligação dos espermatozoides ao reservatório da tuba uterina, que aumenta a vida útil do espermatozoide e diminui as chances de poliespermia. Nesse sentido o objetivo do presente trabalho foi comparar a cinética e ligação da tuba uterina aos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo com e sem adição de plasma seminal. Utilizou-se 8 garanhões da raça Minihorse para o resgate de espermatozoides da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado. Após a colheita foi dividido em 4 grupos, LD apenas com diluente a base de leite desnatado, GO recebeu adição de diluente para congelação a base de gema de ovo, PSB plasma seminal de garanhão com alta fertilidade e capacidade de refrigeração, e PSR plasma seminal de garanhão com fertilidade e capacidade de refrigeração inferiores. Foi avaliado cinética, integridade de membrana espermática e a taxa de ligação à explantes da tuba uterina. Não apresentaram diferença na integridade da membrana nem na taxa de ligação, no entanto, observou-se diferença quanto a cinética espermática. Conclui-se que a adição de plasma seminal de diferentes garanhões interferiu, de forma diferente na cinética de espermatozoides da cauda do epidídimo aumentando a motilidade total e progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos. No entanto não foi observado diferença ($p < 0,05$) nas taxas de ligação de espermatozoides da cauda do epidídimo por área de explante entre os grupos que receberam e os que não receberam adição de plasma seminal.

Palavras-chave: garanhão, teste de ligação, cinética espermática

CANUTO, L.E.F. EFFECT OF SEMINAL PLASMA ON SPERMATOZOA BINDING FROM EQUINE EPIDIDYMIS TAIL TO UTERINE TUBA EXPLANTS. Botucatu – SP. 2019. 42p. São Paulo State University - School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

Sperm retrieval from the tail of the epididymis is one of the main alternatives in cases of unexpected death, euthanasia, obstructive processes, therapeutic castration. In this technique spermatozoa do not come into contact with the seminal plasma, not incorporating their constituents, which interfere in the physiological processes important for fertilization, such as sperm binding to the uterine tube reservoir, which increases sperm life and decreases the chances of polyspermia. In this sense, the objective of the present study was to compare the kinetics and uterine tubal attachment to the spermatozoa recovered from the tail of the epididymis with and without addition of seminal plasma. Eight minihorse stallions were used to retrieve spermatozoa from the tail of the epididymis by the retrograde flow technique. After harvesting was divided into 4 groups, LD only with diluent the skim milk base, GO received addition of diluent for freezing the egg yolk, PSB seminal stallion plasma with high fertility and cooling capacity, and PSR seminal plasma fertility and lower cooling capacity. Kinetics, spermatoc membrane integrity and the rate of binding to the explants of the uterine tube were evaluated. There was no difference in membrane integrity or binding rate, however, a difference was observed in spermatoc kinetics. It was concluded that the addition of seminal plasma of different stallions interfered, differently in spermatozoa kinetics of the tail of the epididymis increased total and progressive motility and the percentage of fast spermatozoa. However, no difference ($p < 0.05$) was observed in sperm binding rates of the tail of the epididymis per explant area between the groups that received and those not receiving addition of seminal plasma.

Key-words: stallion, bonding test, sperm motility

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias aplicadas à espécie equina é uma maneira de acelerar o ganho genético e competitividade na indústria do cavalo, visando a conservação do material genético de animais de alto valor zootécnico para maximizar sua utilização. Dentre estas, pode ser destacada a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de reprodutores que sofreram algum trauma ou enfermidade que impossibilita a colheita do sêmen, ou que tenham vindo a óbito por causa natural ou eutanásia. Nestes casos, muitos proprietários têm buscado uma última recuperação dos gametas na tentativa de obter mais produtos com a genética valiosa daqueles animais.

Em 1957 foi relatada a primeira prenhez utilizando espermatozoides congelados na espécie equina, sendo em uma égua inseminada com espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (BARKER e GANDIER, 1957). Apesar da fertilidade desses espermatozoides ser confirmada desde esse estudo ainda existem questionamentos quanto a sua capacidade de interação no sistema reprodutivo da fêmea, estimulando assim mais estudos nessa área.

Segundo Papa et al. (2008), os estudos com epidídimos equinos envolvem o desenvolvimento de técnicas de colheita, comparação de diferentes meios diluentes, refrigeração, viabilidade espermática após adição de plasma seminal, viabilidade espermática de garanhões subférteis, fertilidade e metodologias de inseminação e injeção intracitoplasmática desses espermatozoides.

Tanto os componentes moleculares dos espermatozoides quanto os dos meios que os cercam influenciam na capacidade fertilizante. As proteínas do plasma seminal, por exemplo, modulam funções e processos importantes na reprodução, como a cinética e capacitação espermática, proteção celular, reação acrossômica e fertilização (BOUÉ et al., 1996).

No entanto, espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, independente da técnica, não entram em contato com o plasma seminal, logo não incorporam suas proteínas, lipídeos e íons que certamente participam de processos fisiológicos importantes para a fertilização.

Existem diversos estudos sobre os vários componentes bioquímicos do plasma seminal e progressos têm sido feitos especialmente no campo da proteômica. Contudo, pouco se sabe a respeito da importância destes na adesão dos espermatozoides

provenientes do epidídimo aos sítios de ligação das células epiteliais da tuba uterina da espécie equina.

Segundo Suarez, (2008), o reservatório espermático das fêmeas mamíferas está localizado principalmente na tuba uterina, na região do istmo. Suas funções ainda não estão completamente elucidadas, contudo as células espermáticas ficam retidas no reservatório espermático da tuba uterina.

Na espécie bovina, De Pauw et al. (2002) relataram diferentes taxas de ligação de espermatozoides a explantes da tuba uterina quando comparados diferentes touros, ressaltando a existência de fatores individuais que podem interferir na ligação. Também observaram uma correlação positiva entre a taxa de adesão dos espermatozoides às células da tuba e fertilidade do animal, sugerindo, que o teste *in vitro* de ligação poderia prever a fertilidade na espécie estudada.

Com base nessas informações, nota-se a importância e a necessidade de estudos na área para melhor compreensão da fisiologia espermática, esclarecimento das funções do plasma seminal na interação com os sítios de ligação das células epiteliais da tuba uterina, e consequentemente para melhorar a taxa de fertilidade dos espermatozoides equinos recuperados da cauda do epidídimo.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Composição do ejaculado equino

O ejaculado é composto basicamente por duas porções diferentes: a porção celular que é composta pelos espermatozoides, corresponde menos de 1% do volume total, e a porção referente ao plasma seminal (PS), que constitui a parte líquida que oferece ao sêmen a maior parte do volume total (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

O PS, conjunto de fluidos secretados pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, está envolvido em variadas funções e também em eventos que precedem a fecundação (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

Nos equinos o plasma seminal consiste em um fluido expelido em frações durante a ejaculação e sua composição apresenta diferentes aspectos bioquímicos de acordo com cada fração ejaculada. A primeira fração é a pré-espermática, aquosa, e provém das glândulas bulbouretrais e próstata e realiza a limpeza da uretra. A segunda fração é rica

1994) justificando o maior número de espermatozoides por área ligado do nosso estudo uma vez que realizou-se a seleção de istmos para aquisição dos explantes.

A seleção das tubas de novilhas não gestantes e sem presença de corpo lúteo em ambos ovários, foi realizada visto que pesquisas com espermatozoides humanos evidenciou-se que a presença de progesterona aumenta os níveis de cálcio nos espermatozoides (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), junto com um aumento no pH, produzindo uma hiperativação espermática que impede a ligação dos espermatozoides ao epitélio da tuba uterina, ou produz um desprendimento prematuro (Bureau et al., 2002; Gonzalez et al., 2012; Aalberts et al., 2013).

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a adição de plasma seminal de diferentes doadores interfere de forma diferente na cinética de espermatozoides da cauda do epidídimo, aumentando a motilidade total e progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos quando tiveram contato com o plasma seminal de um garanhão doador com melhor cinética espermática quando comparado a um plasma seminal de um doador com menores valores de cinética. No entanto a adição de plasma seminal não aumentou a taxa de ligação de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo equino por área de explante da tuba uterina bovina, acredita-se que os fatores do plasma seminal que interferem na cinética são diferentes dos responsáveis pela interação do espermatozoide com o epitélio da tuba uterina.

6. Referências

- Aalberts M, Sostaric E, Wubbolts R, Wauben MW, Nolte-'t Hoen EN, Gadella BM, Stout TA, Stoorvogel W et al. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2013;1834(11): 2326-35.
- Bader H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 1982;32:59-64.
- Ball BA, Dobrinski I, Fagnan MS, Thomas PG. Distribution of glycoconjugates in the uterine tube (oviduct) of horses. *American Journal of Veterinary Research* 1997;58:816-822.
- Bruemmer JE, Reger H, Zibinski G, Squires EL. Effect of storage at 5 °C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58: 405-407.
- Bureau M, Bailey JL & Sirard MA. Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles in vitro. *Journal of Andrology* 2002;23:188-193.
- Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, Del Olmo D, Roca J, Martinez EA, et al. Proteínas do plasma seminal como moduladores da função espermática e sua aplicação em biotecnologias espermáticas. *Reproduction in Domestic Animals* 2012;47(3):12-21.
- Carneiro JAM, Monteiro GA, Martin I, Maziero RRD, Sancler-Silva YFR, Freitas-Dell' Aqua CP, Guasti PN, Hartwig FP, Ignácio FS, Landim FC, Alvarenga MA, Papa FO, DELL'AQUA JAJr. Oviduct binding capacity of cryopreserved equine ejaculated and epididymal spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 2017;59:40-48.
- De Pauw IMC, Van Soom A, Laevens H, Verberckmoes S, De Kruif, A. Sperm binding to epithelial explants in bulls with different non-return rates investigated with a new in vitro model. *Biology of Reproduction* 2002;67:1073-1079.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. Sperm-oviduct interaction: Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction* 1999;60:879-86.

- 349 Foye-jackson OT, Long JA, Bakst MR, Blomberg LA, Akuffo VG, Silva MVB, et al.
 350 Oviductal expression of avidin , avidin-related protein-2 , and progesterone receptor in
 351 turkey hens in relation to sperm storage : Effects of oviduct tissue type , sperm presence
 352 , and turkey line. Poultry Science 2011;9:1539-47.
- 353 Gonzalez-Fernandez L, et al. Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine
 354 phosphorylation in stallion sperm. Reproduction 2012;144(4):411-22.
- 355 GuastI PN,Monteiro GA, Maziero RR, Martin I, Avanzi BR, Dellaqua,JA, Papa FO.
 356 Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. Journal of equine veterinary
 357 Science 2013;33(12):1153-56.
- 358 Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma
 359 proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30- kDa share functional roles in storing sperm in
 360 the oviduct. Biology of Reproduction 2006;75:501-507.
- 361 Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. PDC-109 (BSP-A1/ A2) promotes bull sperm
 362 binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal
 363 sperm reservoir. Biology of Reproduction 2003;69:809-815.
- 364 Hartwig FP, Lisboa FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-Dell`Aqua C P, Alvarenga
 365 MA, Papa FO, Dell`Aqua Jr JA. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative
 366 forbad cooler stallions. Theriogenology 2014;81:340-346.
- 367 Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Kelsey N, et al. Porcine Sperm
 368 Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct Reservoir Porcine
 369 Sperm Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct. Biology
 370 of Reproduction 2012;87:147-1.
- 371 Lishko PV, Botchkina IL & Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺C
 372 channel of human sperm. Nature 2011;471:387-391.
- 373 Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA, Melo CM, Maziero RRD, Guasti, PN.
 374 Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. Animal
 375 reproduction science 2011;127(3):197-201.
- 376 Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing
 377 Capacity of Bovine Sperm May to Oviductal Epithelial Be Maintained by Binding.
 378 Biology of Reproduction 1991;44:102-7.

379 SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC

380 Scott MA, Liu IK, Overstreet JW. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their
381 clinical implications. In: Proc Annual Convention Am Association Equine Practitioners
382 1995;41:1-2.

383 Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R & Kaupp UB.
384 The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm.
385 Nature 2011;471:382-386.

386 Thomas PGA, Ball BA, Brinsko SP. Interaction of equine spermatozoa with oviduct
387 epithelial cell *explants* is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant.
388 Biology Reproduction 1994;51:222-228.

389 Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-martinez H. Sperm capacitation in the porcine
390 oviduct. Animal Reproduction Science 2004;80:131-46.

391 Usselman MC, Cone RA. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal
392 epididymis by immobilin, a high molecular weight glycoprotein. Biology of
393 Reproduction 1983;29:1241-1253.

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405