



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS-CAV
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

O estresse oxidativo e a precoce capacitação espermática, gerados na criopreservação do sêmen ovino, reduzem sua viabilidade, principalmente na inseminação cervical. O uso de plasma seminal (PS) e a pressão negativa têm produzido a proteção e reversão desses danos. Dois experimentos avaliaram esses potenciais melhoradores da criotolerância, e um terceiro avaliou dois métodos de IA cervical. No experimento 1 o sêmen ovino foi submetido aos tratamentos: controle (TC), pressão de 200mBar (P200); 500mBar (P500) e 800mBar (P800). No experimento 2 o PS de carneiros, garanhões e touros foi liofilizado (L) e sua proteína dosada. De cada PS, o equivalente a 600µg de proteína por mL, foi adicionado ao diluente de congelamento, compondo os grupos experimentais: controle (TC), PS ovino (PSLO), PS bovino (PSLB) e PS equino (PSLE). O experimento 3 avaliou 2 métodos de IA, a cervical superficial (G1) e a cervical profunda com pinçamento do fundo de saco vaginal (G2). Os dados *in vitro* foram submetidos a análise de variância e teste T, e a taxa de prenhez ao chi-quadrado, todos com significância de 5%.

Orientador: Dr. Alceu Mezzalira

Lages, 2014

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTRATÉGIAS PARA VIABILIZAR O USO DE SÊMEN
CONGELADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL
DE OVINOS

RENATA CASALI

Lages, 2014

RENATA CASALI

**ESTRATÉGIAS PARA VIABILIZAR O USO DE SÊMEN
CONGELADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL DE
OVINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalira.

**LAGES/SC
2014**

| | |
|-------|---|
| C334e | <p>Casali, Renata</p> <p>Estratégias para viabilizar o uso de sêmen congelado na inseminação artificial cervical de ovinos / Renata Casali. - Lages, 2014.</p> <p>74 p. : il. ; 21 cm</p> <p>Orientador: Alceu Mezzalira</p> <p>Bibliografia: 67-74p</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.</p> <p>1. Criopreservação. 2. Pressão negativa. 3. Plasma seminal. 4. FIV heteróloga. 5. Inseminação cervical. I. Casali, Renata. II. Mezzalira, Alceu. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título</p> <p>CDD: 636.3 - 20.ed.</p> |
|-------|---|

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CAV/
UDESC
UDESC

RENATA CASALI

**ESTRATÉGIAS PARA VIABILIZAR O USO DE SÊMEN
CONGELADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL DE
OVINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Banca Examinadora:


Alceu Mezzalana – Orientador


Leandro Rodello – FAEP/SP


Rogéria Ferreira – CEO/UDESC


Fabrício Descomi Mozzaquatro – CAV/UDESC

Lages SC / Fev. 2014

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de laboratório Andressa, Alysson, Aimê, Ana, Carol, Cláudio, Jéssica, Joana, Kauê, Lain, Larissa, Lucas, Zago e tantos outros que colaboraram diretamente ou indiretamente para a concretização do trabalho.

Aos professores e amigos, que proporcionaram condições para que este trabalho fosse executado, Fabrício Desconsi Mozzaquatro, Leandro Rodello, Silvério Bunn, Sony Dimas Biccudo e ao orientador Alceu Mezzalira.

Àqueles que não mediram esforços para que eu pudesse correr atrás do meu sonho: meu pai, Moacir e minha mãe, Denisetete. Cito também minhas irmãs: Débora e Jéssica, grandes amigas e peças primordiais em minhas decisões. Ao Pedro, obrigado por tudo, fico feliz que você esteja ao meu lado neste momento tão importante.

Aos amigos feitos durante o mestrado que me proporcionaram tardes de estudos aliadas a diversão e a tantos outros que passaram pela minha vida neste período, e que de certa forma, deram a sua contribuição.

Aos financiadores UDESC, FAPESC, CNPQ e CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Casali, Renata. **Estratégias para viabilizar o uso de sêmen congelado na inseminação artificial cervical de ovinos**. 2014. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

O estresse oxidativo e a precoce capacitação espermática, gerados na criopreservação do sêmen ovino, reduzem sua viabilidade, principalmente na inseminação cervical. O uso de plasma seminal (PS) e a pressão negativa têm produzido a proteção e reversão desses danos. Dois experimentos avaliaram esses potenciais melhoradores da criotolerância, e um terceiro avaliou dois métodos de IA cervical. No experimento 1 o sêmen ovino foi submetido aos tratamentos: controle (TC), pressão de 200mBar (P200); 500mBar (P500) e 800mBar (P800). No experimento 2 o PS de carneiros, garanhões e touros foi liofilizado (L) e sua proteína dosada. De cada PS, o equivalente a 600µg de proteína por mL, foi adicionado ao diluente de congelamento, compondo os grupos experimentais: controle (TC), PS ovino (PSLO), PS bovino (PSLB) e PS equino (PSLE). O experimento 3 avaliou 2 métodos de IA, a cervical superficial (G1) e a cervical profunda com pinçamento do fundo de saco vaginal (G2). Os dados *in vitro* foram submetidos a análise de variância e teste T, e a taxa de prenhez ao chi-quadrado, todos com significância de 5%. No experimento 1, maior motilidade progressiva (MP) foi observada no TC (49%) frente aos tratamentos P200 (40,9%), P500 (38,9%) e P800 (38,9%). Na MP durante o teste de termo resistência (TTR), MP após percoll (PP), integridade de acrossoma (IAC), IACPP, integridade de membrana (IM) e IMPP, não houve diferença entre os grupos. Na clivagem P800 (34,5%) foi inferior a P200 (51,2%) e P500 (50,9%), não diferindo do controle (44,3%). Conclui-se que a P500 é a mais adequada para uso com sêmen ovino, não reduzindo a viabilidade após o congelamento e proporcionando elevada taxa de clivagem após FIV heteróloga. O experimento 2 avaliou MP, MPPP e clivagem após FIV heteróloga de todos os grupos, sendo o melhor grupo comparado ao controle através de: sistema CASA, integridade de acrossoma (FITC-PSA), estabilidade de membrana (M540); integridade de cromatina (acridina orange); apoptose (anexina) e potencial de mitocôndria (mitotracker). O PSLE apresentou a maior taxa de clivagem (71,37%), evidenciando sua maior capacidade de penetração nos oócitos. Observou-se superioridade do PSLE nos

parâmetros VCL (PC-163,5 μ m/s, PSLE-186,2 μ m/s) e ALH (PC-9 μ m, PSLE-8,2 μ m) do CASA, em relação ao controle. Na citometria de fluxo, o teste da anexina revelou maior quantidade de células viáveis não apoptóticas com o PSLE (38,9%) em relação ao TC (32,1%). No experimento 3 não houve diferença na prenhez após IA superficial (33,3%) e profunda (G2 52,2%), possivelmente devido ao número reduzido de animais.

Palavras-chave: Criopreservação, pressão negativa, plasma seminal, FIV heteróloga, inseminação cervical.

ABSTRACT

Casali, Renata. **Strategies to improve the use of frozen semen in the cervical artificial insemination of sheep**. 2014. 74p. Master Dissertation in Animal Science - Area: Animal Production – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Oxidative stress and premature sperm capacitation, generated during cryopreservation of ram semen, reduces their viability, especially after cervical insemination. The use of seminal plasma (SP) and negative pressure have produced protection and the reversion of such damages. Two experiments evaluated these potential enhancers of cryotolerance, and a third experiment compared 2 methods of cervical AI. In experiment 1 ram semen was subjected to the treatments: (TC) control or negative pressure of 200mBar (P200); 500mBar (P500) and 800mBar (P800). In experiment 2, the PS from rams, stallions and bulls was lyophilized (L) and its protein measured. From each SP 600µg of protein per mL was added to the freezing diluent used, compounding the experimental groups: control (TC), ovine PS (PSLO), bovine PS (PSLB) and equine PS (PSLE). Experiment 3 evaluated 2 methods of AI, the superficial cervical AI (G1), and deep intrauterine or cervical AI with clamping the vaginal fornix (G2). The in vitro data were subjected to ANOVA and test T, and the pregnancy rate to the chi square test, all with 5% significance level. In the experiment 1 higher progressive motility (PM) was observed in TC (49%) compared to P200 (40.9%), P500 (38.9%) and P800 (38.9%) treatments. In PM during the test the thermal resistance (TTR), MP after percoll (PP), acrosome integrity (IAC), IAPP and membrane integrity (MI), there was no difference between the groups. In cleavage rate P800 (34.5%) was less than P200 (51.2%) and P500 (50.9%) did not differ from the control (44.3%). In conclusion the P500 is the most appropriate for use in ram semen cryopreservation, enabling high rates of cleavage after heterologous IVF, maintain membrane integrity. Experiment 2 evaluated MP, MPPP and cleavage rate after heterologous IVF in all groups, with the best group compared with the control in: CASA system; acrosoma integrity (FITC-PSA), membrane stability (M540), chromatin integrity (acridine orange), apoptosis (annexin) and potential of mitochondria (Mitotracker). Also the PSLE showed higher cleavage rate (71.37%), indicating a greater ability to oocyte penetration. The PSLE showed higher VCL (PC-163.5µm/s, PSLE-186.2µm/s) and ALH (PC-

9µm PSLE-8.2µm) in CASA evaluation, compared to control. In flow cytometry the annexin test revealed a greater amount of non-apoptotic viable cells in PSLE (38.9%), compared to TC (32.1%). In experiment 3 there was no difference in pregnancy rates after superficial (33.3%) or deep and intrauterine (52.2%) IA, possibly due to the reduced number of animals used.

Keywords: Cryopreservation, negative pressure, seminal plasma, heterologous IVF, Cervical insemination.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALH**- Amplitude lateral de cabeça
CASA- Análise computadorizada da cinética espermática
FITC PNA- Lectina de *Arachis hypogaea*
FITC PSA- Lectina de *Pisum sativum*
FIV- Fecundação *in vitro*
IA- Inseminação artificial
IAC- Integridade de Acrossoma
IACPP- Integridade de Acrossoma pós percoll
IM- Integridade de membrana
IMPP- Integridade de membrana pós percoll
MP- Motilidade progressiva
MPPP- Motilidade progressiva pós percoll
PIV - Produção *in vitro*
PP- Pós percoll
PS- Plasma seminal
PSLO- Plasma seminal liofilizado ovino
PSLB- Plasma seminal liofilizado bovino
PSLE- Plasma seminal liofilizado equino
TTR- Teste de termo resistência
VCL- Velocidade curvilinear

FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1: Bandas proteicas presentes no plasma seminal ovino (PSO), bovino (PSB) e equino (PSE) indicadas por peso molecular em kDa..... 49

CAPÍTULO 3

Figura 1: Foto ilustrativa dos pistoletes utilizados na IA superficial (esquerda) ou profunda (direita) de ovelhas 61

Figura 3: Foto ilustrativa do pinçamento de tecidos e exteriorização da cérvix, na IA profunda em ovelhas 62

GRÁFICOS

CAPÍTULO 1

Gráfico 1: Valores em porcentagem da motilidade progressiva (MP) de sêmen ovino congelado ao decorrer do TTR (0h, 1h, 2h, 3h), após submissão a pressão negativa de 0 (Controle), 200, 500 ou 800mBar. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro do tratamento nos momentos do TTR, a ausência das letras nos grupos P500 e P800 indicam semelhança ao decorrer do tempo..... 36

TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1: Percentuais e erro padrão da motilidade progressiva (MP) no pós-descongelamento, após 1h, 2h e 3h de teste de Termo Resistência (TTR) e após gradiente de Percoll (PP) de sêmen ovino congelado, após submissão a pressão negativa de 0 (Controle), 200, 500 ou 800mBar..... 35
- Tabela 2: Avaliação percentual e erro padrão da integridade de acrossoma (IAC) e integridade de membrana (IM) após descongelamento e após gradiente de Percoll, de sêmen ovino congelado após submissão a diferentes intensidades de pressão negativa, bem como taxa de clivagem após FIV heteróloga com oócitos bovinos 37

CAPÍTULO 2

- Tabela 1: Percentuais médios e erro padrão de viabilidade espermática avaliados pela motilidade progressiva pós descongelamento (MP-PD) e pós percoll (MP-PP), assim como taxas de clivagem após FIV heteróloga, com sêmen ovino congelado em TRIS sem adição de plasma seminal (TC), ou com a adição de plasma seminal liofilizado ovino (PSLO), bovino (PSLB) ou equino (PSLE) 50
- Tabela 2: Valores de velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) e frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz) e respectivos erros padrão em sêmen ovino congelado em Tris (Cont) e Tris adicionado de plasma seminal equino liofilizado (PSLE) 50
- Tabela 3: Valores percentuais e erro padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) de sêmen ovino congelado em Tris (Cont) e Tris adicionado de Plasma seminal equino liofilizado (PSLE)51
- Tabela 4: Valores em porcentagem de apoptose espermática por anexina, indicando em porcentagem células necróticas,

células viáveis e células apoptóticas e respectivos erros padrão de sêmen ovino congelado em Tris (Cont) ou Tris adicionado de Plasma seminal equino liofilizado PSLE) 51

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Taxas de prenhez após inseminação com sêmen resfriado, por via cervical superficial, ou cervical profunda e intrauterina62

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 23 |
| 2.1 DANOS DECORRENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO.. | 23 |
| 2.2 PRESSÃO HIDROSTÁTICA APLICADA SOBRE CÉLULAS | 24 |
| 2.3 PLASMA SEMINAL | 24 |
| 3 CAPÍTULO 1 PRESSÃO NEGATIVA NO PRÉ- CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO..... | 28 |
| RESUMO..... | 28 |
| ABSTRACT | 29 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 30 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 3.2.1 Obtenção e processamento do sêmen | 31 |
| 3.2.2. Avaliações pós descongelamento | 31 |
| 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 33 |
| 3.4. RESULTADOS | 33 |
| 3.5 DISCUSSÃO | 36 |
| 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |
| 4 CAPITULO 2 PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO LIOFILIZADO AUMENTA A VIABILIDADE DE SÊMEN OVINO CONGELADO..... | 40 |
| RESUMO..... | 40 |
| ABSTRACT | 41 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 4.2.1 Obtenção do plasma seminal | 43 |
| 4.2.2 Obtenção e congelamento do sêmen ovino | 43 |
| 4.2.3 Avaliação do sêmen após descongelamento..... | 44 |
| 4.2.3.1 Avaliações com o sistema CASA | 44 |
| 4.2.3.2 Avaliações por citometria de fluxo..... | 45 |
| 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 47 |
| 4.4 RESULTADOS | 47 |
| 4.5 DISCUSSÃO | 51 |
| 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| 5 CAPITULO 3 INSEMINAÇÃO CERVICAL PROFUNDA POR CATETERIZAÇÃO DA CÉRVIX..... | 58 |
| 5.1 INTRODUÇÃO..... | 58 |
| 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 59 |
| 5.3 RESULTADOS | 61 |
| 5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
| 6 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 64 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS | 66 |

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de biotécnicas reprodutivas que possibilitem melhorar o padrão zootécnico e produtivo do rebanho tem particularidades na espécie ovina. Os resultados pobres e inconsistentes da IA cervical com sêmen congelado (O'MEARA *et al.*, 2007; EL-HAJJ GHAOUI *et al.*, 2007) são determinados por fatores como a baixa qualidade do sêmen ovino no pós congelamento e a anatomia da cérvix ovina.

A baixa fertilidade do sêmen congelado se deve às alterações físicas e químicas ocorridas durante o processo de criopreservação, o que promove a prematura capacitação e a redução da motilidade e da viabilidade espermática. Uma das potenciais causas destas alterações é o estresse oxidativo, com a peroxidação dos lipídios de membrana e fragmentação do DNA espermático (DONOVAN *et al.*, 2004). Associado a isso, a anatomia da cérvix ovina constitui uma importante barreira à penetração espermática, em função do comprimento e excentricidade dos anéis cervicais (ÁLVAREZ *et al.*, 2000), algo que reduz a taxa de penetração cervical na inseminação (SALAMON; MAXWELL, 2000) e dificulta a IA transcervical.

Estas limitações determinaram que historicamente o emprego de sêmen ovino congelado estivesse condicionado ao método de inseminação intra-uterina por laparoscopia (SALAMON; MAXWELL, 1995). Todavia, restrições vinculadas ao custo do equipamento, as condições de infra-estrutura e principalmente a necessidade de profissionais especializados, ainda dificultam a difusão da técnica (KERSHAW *et al.*, 2005). A busca por técnicas que aumentem a qualidade seminal e consequentemente a fecundação é desejável e necessária.

Estudos demonstram que a indução de alguma modalidade de estresse controlado, desencadeia a produção de proteínas protetoras, como as *Heat shock proteins*, possibilitando uma maior criotolerância de gametas e embriões (PRIBENSKY; VAJTA, 2011). Um equipamento (Nitrocooler) que tem a finalidade de aplicar pressão negativa a estruturas como gametas e embriões, proporcionou melhores resultados na criotolerância de oócitos (SANTOS, 2006) e blastocistos bovinos (MEZZALIRA *et al.*, 2010), porém ainda não foi utilizado em células espermáticas.

Barrios *et al.* (2000; 2005) avaliaram o comportamento da célula espermática submetida a um estresse térmico (5 min / 10°C) na presença do plasma seminal demonstrando efeitos adjuvantes do plasma seminal (PS)

quando adicionado ao sêmen de carneiro. Estudos mais recentes também demonstram os efeitos protetores da adição do PS antes do choque térmico (MUINO-BLANCO *et al.*, 2008). O PS também tem sido utilizado em protocolos de congelamento de sêmen de carneiro (EVANS *et al.*, 2000; DOMINGUEZ *et al.*, 2008; LEAHY *et al.*, 2009; LEAHY *et al.*, 2010) com efeitos benéficos nos danos causados pela criopreservação, já que protege e repara os espermatozoides tanto no nível estrutural quanto no funcional (MUINO-BLANCO *et al.*, 2008). Entretanto, o reduzido volume do ejaculado do carneiro e o risco de transmissão de doenças espécie específicas, são importantes entraves para o uso do PS homólogo. Uma alternativa seria o uso de PS de espécies com maior volume de ejaculado, viabilizando a formação de bancos de PS, bem como contornando os riscos sanitários decorrentes do uso de PS homólogo. O efeito positivo da adição de plasma seminal heterólogo ao sêmen congelado ovino foi demonstrado por Martins *et al.* (2013).

Uma limitação para o uso de PS *in natura* é a diluição do sêmen, com a consequente redução da sua concentração espermática, que é limitante na IA cervical. Uma alternativa a esse entrave seria a liofilização do PS, antes de sua adição ao meio de congelamento, evitando o aumento do volume final.

Recentemente, foi desenvolvido um aplicador, que associado ao pinçamento do fundo de saco vaginal, facilita a cateterização do cérvix, permitindo uma IA cervical profunda ou até mesmo intra-uterina, o que pode melhorar as taxas de fecundação com sêmen congelado. Todavia, não existem trabalhos avaliando comparativamente esta metodologia.

Assim, este estudo compreende 3 capítulos que correspondem a 3 experimentos. O primeiro experimento trabalha com a célula espermática, avaliando o efeito da aplicação de pressão negativa no pré-congelamento do sêmen ovino; o segundo trabalha com o diluente de congelamento, avalia o efeito da adição do plasma seminal heterólogo liofilizado ao diluente e o terceiro trabalha com o método de IA cervical comparando dois métodos, IA via cervical superficial versus a IA cervical profunda. O protocolo de congelamento com os aditivos propostos, associado ao melhor método de inseminação, deverá possibilitar o uso de sêmen congelado de carneiros na inseminação artificial cervical de ovelhas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 DANOS DECORRENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO

As células espermáticas contêm alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados que são particularmente susceptíveis a danos oxidativos, especialmente após a criopreservação. Isto determina a subsequente perda na integridade de membrana, comprometendo a função celular e diminuindo a motilidade e a capacidade fecundante. A composição lipídica da membrana do espermatozoide é o maior determinante para a sua viabilidade (BUCAK *et al.*, 2008). Lesões ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais causadas pelos processos de congelamento e descongelamento promovem a redução da motilidade e do transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (SALOMON; MAXWELL, 1995).

A criolesão espermática promove a prematura indução de um estado semelhante de capacitação, a chamada criocapacitação (BAILEY *et al.*, 2000). A capacitação prematura do espermatozoide altera a motilidade, a viabilidade e posteriormente a sua longevidade (GILLAN; MAXWELL, 1999), resultando em menores taxas de prenhez quando o sêmen congelado é usado.

Situações de estresse como mudança na temperatura, estresse osmótico e tóxico do crioprotetor, além do gelo formado no ambiente extracelular, observadas no processamento do sêmen, podem ser responsáveis por fatores que prejudicam a função celular (WATSON, 2000).

Há indícios que espermatozoides congelados estão associados a alta incidência de mortalidade embrionária precoce (SALAMON; MAXWELL, 1995). Elementos do citoesqueleto embrionário são sensíveis a alteração na temperatura e o resfriamento resulta na despolarização dos filamentos de actina (SAUNDERS; PARKS, 1999).

Conseqüentemente, alternativas que preservem a viabilidade seminal no pós-descongelamento, permitindo que um maior número de espermatozoides alcance o ponto de fecundação, podem aumentar as taxas de prenhez. Nesse sentido, diversos aditivos têm sido utilizados visando prevenir ou reduzir os danos causados durante o processamento seminal (diluição, resfriamento, congelamento e reaquecimento). Em protocolos de criopreservação, há a necessidade de otimizar não só a quantidade de espermatozoides vivos, mas a funcionalidade dos mesmos.

2.2 PRESSÃO HIDROSTÁTICA APLICADA SOBRE CÉLULAS

Alguns fatores que circundam as células, como mudanças na temperatura, pH e osmolaridade da solução podem servir como agentes causadores de estresse promotores de uma resposta celular em diferentes níveis (PRIBENSKY, 2011). A aplicação de pressão é uma modalidade de estresse controlado que atinge de maneira uniforme e precisa a célula, demonstrando ser uma alternativa promissora para uma protetora reação celular.

Pribenszky *et al.* (2004) utilizaram pressão hidrostática positiva com o intuito de provocar uma modalidade de estresse controlado sobre os gametas. Os estudos demonstram que a indução de alguma modalidade de estresse controlado, aumenta a criotolerância de gametas e embriões (PRIBEBSZKY; VAJTA, 2011). Outros trabalhos também comprovaram os benefícios do estresse controlado na criotolerância de blastocistos murinos (PRIBEBSZKY *et al.*, 2005a) e espermatozoides bovinos (PRIBEBSZKY *et al.*, 2007), assim como em blastocistos bovinos (PRIBEBSZKY *et al.*, 2005b). A técnica também foi utilizada em estruturas sabidamente mais sensíveis, tais como espermatozoides suínos (HUANG *et al.*, 2009), equinos (BURNAUGH *et al.*, 2010) e até mesmo oócitos suínos (DU *et al.*, 2008), sendo ainda constatada a melhora na qualidade de blastocistos ovinos (BOGLIOLO *et al.*, 2010).

As explicações para o aumento da criotolerância com a aplicação da pressão em células é a sua resposta ao estresse, que induz a modificações na expressão gênica, modificação do mRNA após transcrição, modificações de proteínas por fatores pós transcricionais e indução e interação entre diversas proteínas e proteínas do DNA (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

Com certa analogia foi desenvolvido um equipamento (Nitrocooler) no Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem, que possibilita a aplicação de pressão negativa a estruturas. O “Nitrocooler” proporcionou melhores resultados na criotolerância de oócitos (SANTOS *et al.*, 2006) e incrementou a criotolerância de blastocistos bovinos PIV, efeito este que foi dependente do tempo proporcionado entre a indução do estresse e a criopreservação (MEZZALIRA *et al.*, 2010). Todavia, ainda não há dados de utilização do Nitrocooler com células espermáticas.

2.3 PLASMA SEMINAL

O plasma seminal (PS) de mamíferos é uma secreção fisiológica produzida a partir de múltiplas glândulas do trato reprodutivo do macho. É composto de numerosas moléculas, bem como de uma fração vesical (EL-HAJJ GHAOUI *et al.*, 2006). Tem a capacidade de inibir e estimular a função espermática e a fertilidade. Relatos em várias espécies sugerem que o PS contém fatores que podem influenciar a viabilidade espermática, afetando a motilidade, e a sobrevivência no pós-descongelamento (GRAHAM, 1994; MAXWELL *et al.*, 1997). O plasma seminal de ovinos também demonstrou importância para o transporte de espermatozoides pelo trato genital da fêmea, por ser rico em prostaglandinas (GUSTAFSSON *et al.*, 1977).

No tratamento *in vitro* de espermatozoides, em preparação para a inseminação artificial (IA), envolvendo processos tais como a diluição, resfriamento, congelamento, reaquecimento e sexagem por citometria de fluxo, ocorre a remoção do plasma seminal o que pode modificar as proteínas ligadas à superfície do espermatozoide. Isso desestabiliza as membranas e pode pré-capacitar os espermatozoides, encurtando sua vida útil para a fecundação. O plasma seminal contém proteínas que previnem a capacitação, o que aumenta a longevidade do sêmen de carneiro congelado (MAXWELL *et al.*, 2007).

O PS fornece componentes que estabilizam a membrana dos espermatozoides descongelados (EVANS *et al.*, 2000). Maxwell e Evans (1999) examinaram o efeito da re-suspensão de espermatozoides de carneiro em 20-30% de PS pós-descongelamento e estabeleceram que a penetração dos espermatozoides através do muco cervical foi melhorada, resultando em fertilidade significativamente superior, depois da IA cervical.

Mortimer e Maxwell (2004), relatam que espermatozoides descongelados e re-suspendidos em PS artificial ou PS de carneiro melhoram o movimento e aumentam a estabilidade de membrana, quando comparados a aqueles re-suspendidos em PBS, sugerindo que isto foi devido aos componentes presentes no meio. Já O'Meira *et al.* (2007) observaram diferenças na fertilidade entre carneiros (17,7 - 45,2%) após a IA cervical de ovelhas com sêmen descongelado, o que pode ser atribuído a diferenças nos componentes do plasma entre os machos.

A adição de PS em sêmen descongelado melhora a motilidade, a viabilidade, a integridade de acrossoma e a respiração mitocondrial. Estes efeitos benéficos foram atribuídos as proteínas do PS especialmente RSVP14 e RSVP20 (BARRIOS *et al.*, 2005). Estas proteínas tem capacidade antioxidante (MARTI *et al.*, 2007), efeito que está relacionado a proteção contra o estresse

oxidativo e a capacitação prematura do espermatozoide (MUINO-BLANCO *et al.*, 2008). Maxwell *et al.* (1999) demonstraram benefício na qualidade espermática *in vitro*, assim como na fertilidade após inseminação cervical com sêmen congelado com uso de plasma seminal em ovinos, contrapondo os dados de Leahy *et al.* (2010) onde a melhora foi observada apenas *in vitro*.

Barrios *et al.* (2005) isolou a proteína p14 e p20 kd, demonstrando que são responsáveis pelo efeito protetor ao choque térmico e que a p20 tem tendência de estar relacionada com a decapacitação. Plasma seminal quando adicionado ao sêmen congelado / descongelado (junto com uma fonte de energia) repara danos de espermatozoides ovinos, melhorando a motilidade espermática (BERNARDINIA *et al.*, 2011). Aparentemente o plasma seminal sofre influência da estação do ano. O efeito protetivo do plasma seminal é maior quando coletado na estação de monta (LEAHY *et al.*, 2010). Dominguez *et al.* (2008) demonstraram que o plasma seminal coletado no inverno ou outono aumenta a motilidade espermática total e progressiva no sêmen de ovinos.

Proteínas do PS bovino também interagem com fosfolipídeos na membrana plasmática da célula espermática e participam na desestabilização (capacitação) e estabilização (decapacitação) da membrana do espermatozoide (THERIEN *et al.*, 2005). Estes achados são consistentes com a ideia de que o efeito do PS está associado com a presença de uma capa de componentes que mantém a estabilidade de membrana até o processo de capacitação, os chamados fatores decapacitantes (VADNAIS; ROBERTS, 2007; MUINO-BLANCO *et al.*, 2008).

No plasma seminal de bovinos um grupo de proteínas chamadas BSP, quando associadas na superfície das células, modulam a capacitação espermática. Proteínas homologas foram reportadas em garanhões (MENARD *et al.*, 2003) e em ovinos (JOBIM *et al.*, 2005).

Evidências experimentais sugerem que a Osteopontina (Proteína do plasma de Touros) afeta a ligação esperma-oócito, que provavelmente é a razão pela qual foi encontrada associada a taxas de não retorno ao cio, após uso do sêmen destes touros. A identificação destes componentes ajudará a entender e diagnosticar casos de infertilidade e ou subfertilidade, além de aumentar a precisão da previsão do desempenho reprodutivo masculino (MOURA, 2005). Touros subfêrteis, que mostram espermograma normal, são importantes fontes de estudo e tem estimulado a busca de outros marcadores de fertilidade, como

os componentes moleculares do plasma seminal (BRAUDMEYER; MILLER, 2001).

Em javalis, estudos recentes mostram relações negativas entre algumas proteínas do plasma seminal e a fertilidade (NOVAK *et al.*, 2010). Em touros, proteínas específicas no plasma seminal foram associadas com a fertilidade (KILLIAN *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2006), enquanto que no plasma seminal equino, uma proteína foi considerada positiva (72 kDa, pI 5,6, Osteopontina).

Atualmente, o conhecimento disponível sobre os efeitos do conteúdo de PS em espermatozoides e fertilidade parece disperso e às vezes conflitantes. Isto pode ser visto como um forte motivador para novas pesquisas nesta área (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Este estudo é composto de três experimentos, apresentados como capítulos distintos.

3 CAPÍTULO 1 PRESSÃO NEGATIVA NO PRÉ-CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO

Artigo a ser enviado a um periódico com corpo editorial

RESUMO

O estresse por pressão positiva melhora a criotolerância de gametas e embriões de mamíferos. A pressão negativa melhora criotolerância de embriões bovinos PIV, porém ainda não foi testada com sêmen. Como objetivo de estabelecer a melhor pressão a ser aplicada no pré-congelamento de sêmen ovino, bem como avaliar seu efeito na criotolerância, um pool de sêmen ovino foi diluído 1+3 em meio Tris-gema glicerolado e fracionado em 4 alíquotas, onde o controle não recebeu pressão negativa e os demais receberam a pressão 200mBar (P200); 500mBar (P500) e 800mBar (P800). O sêmen foi resfriado e congelado em TK3000 Compact (5 replicações). Foram avaliadas a motilidade progressiva (MP) no pós-descongelamento, durante o TTR (1,2 e 3h) e após Percoll (MPPP); integridade de acrossoma (IAC) pela coloração FITC-PNA e a integridade de membrana plasmática (IM) pelo teste hiposmótico pós descongelamento e pós Percoll (PP); e a taxa de clivagem após a FIV heteróloga. Os dados foram avaliados pelo teste T com significância de 5%. Após o descongelamento a MP do grupo Controle (49%) foi superior a P200 (40,9%), P500 (38,9%) e P800 (38,9%), que não diferiram entre si. Não houve diferença para MP entre os grupos PC, P200, P500 e P800 durante o TTR 1 h (43,4%; 37,9%; 36,9% e 37,9%, respectivamente), 2 h (40,8%; 31,8%; 34,8%; e 36,8%, respectivamente) e 3 h (34,8%; 28,7%; 33,8% e 29,8%, respectivamente), o que se repetiu em relação a IAC (55,4%; 52,4%; 49,5% e 49,8%, respectivamente), a MPPP (66%; 59,2%; 51,7% e 63,2%, respectivamente), a IACPP (46,4%; 45,7%; 46,2% e 49,3%, respectivamente), IM (36,6%, 30,2%, 34,3% e 30,4%, respectivamente) e IMPP (45,4%; 39,9%; 47,3% e 41,1%, respectivamente). Quando avaliada a motilidade ao decorrer do TTR dentro de cada grupo apenas os grupos P500 e P800 não apresentaram redução significativa da mesma (de 0h a 3h). Quanto a clivagem, observou-se que a P800 (34,5%) foi inferior aos grupos P200 (51,2%) e P500 (50,9%), mas não diferiu do controle (44,3%). Com base nos dados obtidos, conclui-se que a pressão negativa de 500mBar é a mais adequada para uso no pré-congelamento de sêmen ovino, não reduzindo a sua viabilidade após o congelamento e

possibilitando elevada taxa de clivagem após FIV heteróloga com óocitos bovinos.

Palavras Chave: Criopreservação. Nitrocooler. FIV heteróloga.

ABSTRACT

NEGATIVE PRESSURE IN THE PRE-FREEZING OF OVINE SEMEN

The positive pressure stress improves cryotolerance of mammals gametes and embryos. The negative pressure improves cryotolerance of bovine IVP embryos, but has not been tested with semen. To establish the ideal pressure to be applied in the pre-freezing of ram semen, and to evaluate its effect on cryotolerance, a pool of ram semen was diluted 1 + 3 in Tris - yolk glycerol medium, and fractionated into 4 aliquots, namely: control, negative pressure of 200mBar (P200); 500mBar (P500) and 800mBar (P800). The semen was loaded in 0.25mL straws and frozen in a Compact TK3000 equipment (5 replications). Progressive motility (MP) was assessed after thawing and during TTR (1, 2 and 3 hours). It was also assessed the acrosome integrity (IAC) by FITC PNA staining, membrane integrity (MI) by hypoosmotic test, MP after percoll selection (MPPP), acrosome integrity post percoll (IACPP), membrane integrity post percoll (IMPP), and cleavage rate after heterologous IVF with bovine oocytes. Data were analyzed by T test with 5% significance level. Just after thawing, the Control group showed higher MP (49%) than P200 (40.9%), P500 (38.9%) and P800 (38.9%), whose do not differ. There was no difference between MP in the PC, P200, P500 and P800 groups during TTR 1h (43.4%, 37.9%, 36.9% and 37.9%, respectively), 2h (40.8%, 31.8%, 34.8% and 36.8%, respectively) and 3 hr (34.8%, 28.7%, 33.8% and 29.8%, respectively), and also in IAC (55.4%, 52.4%, 49.5% and 49.8%, respectively), the MPPP (66%, 59.2%, 51.7% and 63.2%, respectively), the IACPP (46.4%, 45.7%, 46.2% and 49.3%, respectively), IM (36,6%, 30,2%, 34,3% e 30,4%, respectively) and IMPP (45.4%, 39.9%, 47.3% and 41.1%, respectively). When assessing the motility during the TTR within each group only P500 and P800 groups showed no significant reduction of the same (0h to 3h). In cleavage rate evaluation, it was observed that P800 (34.5%) was lower than P200 group (51.2%) and P500 (50.9%) but did not differ from control (44.3%). With basis on obtained data, it was concluded that 500mbar negative pressure is the most appropriate for use

in pre-freezing of ram semen, by not reducing their viability after freezing and enabling high rates of embryo development after heterologous IVF with bovine oocytes.

Key-words: Cryopresevation. Nitrocooler. Heterologous IVF.

3.1 INTRODUÇÃO

O uso de sêmen ovino congelado está condicionado ao emprego do método de inseminação intra-uterina por laparoscopia (SALAMON; MAXWELL, 1995). Isto decorre das alterações físicas e químicas durante o processo de criopreservação, que promove a prematura capacitação, a redução da motilidade e da viabilidade do sêmen ovino.

Nos últimos anos, várias metodologias foram testadas com intuito de preservar com mais eficácia células. O efeito do estresse controlado sobre a fisiologia celular vem sendo amplamente estudado, havendo forte evidência que a pressão positiva melhora a qualidade de gametas e embriões criopreservados (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011). A submissão à pressão positiva promoveu um incremento em até 2,4 vezes na motilidade do sêmen suíno congelado (PRIBENSZKY *et al.*, 2005). KUO *et al.* (2008) também observaram o nascimento de leitegadas mais numerosas com inseminação empregando sêmen congelado submetido à pressão positiva. O estresse controlado induzido pela pressão positiva também demonstrou aumento na criotolerância de espermatozoides de outras espécies, como os bovinos (PRIBENSZKY *et al.*, 2007).

O aumento da criotolerância das células quando submetida a pressão é devido a resposta das mesmas ao estresse, que induz a modificações na expressão gênica, modificação do mRNA após transcrição, modificações de proteínas por fatores pós transcricionais e indução e interação entre diversas proteínas e proteínas do DNA (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

Com certa analogia foi desenvolvido um equipamento (Nitrocooler) no Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem que aplica, com baixo custo e fácil aplicabilidade, pressão negativa a estruturas. O “Nitrocooler” proporcionou melhores resultados na criotolerância de oócitos (SANTOS *et al.*, 2006) e incrementou a criotolerância de blastocistos bovinos PIV (MEZZALIRA *et al.*, 2010). Porém ainda não há dados de utilização do Nitrocooler no pré-congelamento de células espermáticas.

Como uma alternativa para baixa criotolerância dos espermatozoides ovinos, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial efeito da pressão negativa, bem como estabelecer a melhor pressão a ser aplicada no pré-congelamento de sêmen ovino.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem e na Estação Experimental de Pesquisa Agropecuária (EPAGRI) em Lages, Santa Catarina. Como doadores de sêmen foram utilizados 2 carneiros adultos das raças Lacaune e Milschaff, sendo realizados cinco rotinas de congelamento. De cada congelamento foram avaliadas duas palhetas.

3.2.1 Obtenção e processamento do sêmen

Para composição do *pool* de sêmen, os carneiros foram coletados com auxílio de vagina artificial, sendo este imediatamente diluído na proporção 1+1,5 com tris-gema. O material foi dividido em 4 grupos experimentais, Grupo 1: controle (sem aplicação de tratamento), Grupo 2: Aplicação de pressão negativa de 200mBar, Grupo 3: Aplicação de pressão negativa de 500mBar e Grupo 4: Aplicação de pressão negativa de 800mBar. A pressão foi aplicada por 3 minutos com auxílio do equipamento Nitrocooler, desenvolvido pelo laboratório de Reprodução animal Assis Roberto de Bem. Após a submissão aos tratamentos, a diluição foi completada com tris-gema glicerolado resultando em uma final de 1+3 e uma concentração espermática em torno de 180 milhões de espermatozoides por palheta, todas as palhetas foram submetidas ao mesmo processo de resfriamento e congelamento, realizados no equipamento TK3000. As doses foram armazenadas em botijão criogênico até as avaliações.

3.2.2. Avaliações pós descongelamento

O sêmen foi descongelado a 37° por 20 segundos e em seguida submetido às avaliações *in vitro*. As avaliações consistiram no teste de termo resistência através de mensurações da motilidade espermática por 3 horas (HENRY *et al.*, 1998), integridade de membrana plasmática (IM) por teste

hiposmótico, integridade de acrossoma através de coloração FITC-PNA; as mesmas avaliações foram repetidas após seleção por gradiente de percoll e o pellet selecionado foi utilizado para fecundação *in vitro* (FIV) heteróloga realizada com oócitos bovinos (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2009).

Para avaliação da IM foi adicionado 10 µl de sêmen a uma solução osmótica de 50 mOsm/l pelo período de 15 min. Posteriormente foi realizada a avaliação em microscópio óptico, sendo contadas 200 células espermáticas por lâmina. Células com cauda dobrada indicavam membrana íntegra. Para a análise da integridade da membrana acrossômica foram utilizadas as sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (IP; P4170) e o conjugado *lectin from Arachis hypogaea* (FITC-PNA; L7381- Sigma-Aldrich Chemical Company®). A avaliação foi realizada conforme o protocolo descrito por Sukardi *et al.* (1997).

Para a FIV heteróloga, a metodologia empregada foi baseada no trabalho de Garcia-Alvarez *et al.* (2009). Ovários bovinos provenientes de abatedouro foram coletados e transportados em recipiente térmico até o laboratório. Folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm foram puncionados com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após 15 minutos de espera, o sedimento contido nos tubos foi vertido numa placa de Petri, para a busca dos oócitos. A busca foi realizada em líquido folicular centrifugado, sob lupa estereomicroscópica. Após a busca, os oócitos foram selecionados de acordo com o aspecto morfológico, utilizando-se apenas oócitos de qualidade boa ou excelente (LOOS *et al.*, 1989) nos experimentos. Em seguida, os oócitos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de aproximadamente 25, para constituir os tratamentos. Os grupos formados foram depositados em 400µl do meio de maturação *in vitro*, (TCM-199 suplementado com FSH e LH e soro fetal bovino) em placas de cultivo 4 poços, permanecendo por 22 a 24 horas em estufa à temperatura de 39°C, com 5% de CO₂ e umidade saturada.

Para a fecundação *in vitro* (DO), os oócitos foram parcialmente desnudos mecanicamente, através de pipetagens sucessivas, e posteriormente passados às placas de fertilização com 400µl de meio SOF (suplementado com 10% de soro fetal bovino, piruvato de sódio, PHE e BSA), segundo Garcia-Alvarez *et al.* (2009). A seleção espermática foi realizada através de gradiente de Percoll 45 e 90%. Após, realizou-se a avaliação da motilidade espermática e determinação da concentração de espermatozoides, sendo utilizada uma concentração de 1x10⁶ espermatozoides/mL de meio, para a inseminação. A co-incubação dos oócitos/espermatozoides foi conduzida em estufa de cultivo a

39°C, com 5% de CO₂ em ar, com umidade saturada, por um período de 18 a 22 horas. Após este período, as estruturas foram novamente desnudadas mecanicamente através de pipetagens sucessivas, realizando-se a passagem dos oócitos fecundados para as placas de cultivo, contendo meio SOF, suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibiótico e piruvato.

No segundo dia de cultivo (D0= FIV) os oócitos/zigotos foram avaliados quanto à taxa de clivagem. As estruturas foram fixadas em 400 µL de formol. Após fixação foram corados em 400µL de álcool absoluto contendo 10µL de Bisbenzimid Thihydrochloride, permanecendo neste meio por um período de 8 minutos. Logo após, foi adicionada uma gota de aproximadamente 10µL de glicerol sob lamina e lamínula, onde as estruturas em grupos (n=5) foram imersas. Foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, America Inc., Sapporo, Japão), em filtro WU, com excitações de 450-490nm e emissão 520nm em aumento de 1000x, para visualização, ou não, dos pró núcleos, masculinos e femininos.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis, taxa de clivagem após FIV heteróloga, motilidade progressiva no TTR (1, 2 e 3h) e pós-percoll, integridade de acrossoma no pós-descongelamento e pós-percoll e integridade de membrana plasmática no pós-descongelamento e pós-percoll, foram avaliadas pelo teste T com significância de 5% pelo programa estatístico Jump. As variáveis motilidade pós-percoll e os tempos do TTR foram normalizados pelo arco-seno.

3.4. RESULTADOS

A motilidade progressiva pós-descongelamento foi reduzida pela pressão negativa (49%, 40,9%, 38,9% e 38,9%; para controle, P200, P500 e P800 respectivamente). Porém, nas avaliações realizadas entre os grupos durante o TTR (1h, 2h e 3h) e a motilidade progressiva pós-Percoll (MPPP) não apresentou diferenças estatísticas (Tabela 1).

Tabela 1: Percentuais e erro padrão da motilidade progressiva (MP) no pós-descongelamento, após 1h, 2h e 3h de Teste de Termo Resistência (TTR) e após gradiente de Percoll (PP) de sêmen ovino congelado,

após submissão a pressão negativa de 0 (Controle), 200, 500 ou 800mBar.

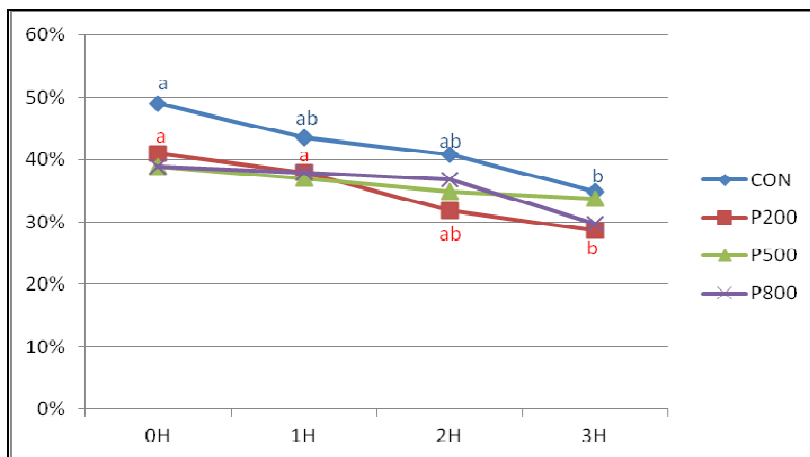
| GRUPOS | AVALIAÇÃO (%) | | | | |
|----------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | MP (pós- descongelament o) | MP (TTR 1h) | MP (TTR 2h) | MP (TTR 3h) | MPPP |
| Controle | 49,0 ± 3,3 ^a | 43,5 ± 4,3 ^a | 40,8 ± 4,8 ^a | 34,8 ± 4,8 ^a | 66,0 ± 1,9 ^a |
| P200 | 40,9 ± 4 ^b | 37,9 ± 3 ^a | 31,8 ± 3,7 ^a | 28,7 ± 3,7 ^a | 59,2 ± 4,6 ^a |
| P500 | 38,9 ± 3,3 ^b | 36,9 ± 3,8 ^a | 34,8 ± 4 ^a | 33,8 ± 3,7 ^a | 59,2 ± 8,6 ^a |
| P800 | 38,9 ± 3,3 ^b | 37,9 ± 4,4 ^a | 36,8 ± 7,1 ^a | 29,8 ± 3,7 ^a | 63,2 ± 4,1 ^a |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte:Próprio autor (2014)

Quando avaliados os dados ao decorrer do TTR, observou-se a redução significativa da motilidade dentro de cada grupo, apenas os grupos P500 e P800 não apresentaram diferença ao decorrer do TTR de 0h até a 3h (Gráfico 1).

Gráfico 1: Valores em porcentagem da motilidade progressiva (MP) de sêmen ovino congelado ao decorrer do TTR (0h, 1h, 2h, 3h), após submissão a pressão negativa de 0 (Controle), 200, 500 ou 800mBar. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro do tratamento nos momentos do TTR, a ausência das letras nos grupos P500 e P800 indicam semelhança ao decorrer do tempo.



Fonte: Próprio autor (2014)

Não foram observadas diferenças em relação à integridade de acrossoma (IA) pós-descongelamento, integridade de acrossoma após gradiente de Percoll, integridade de membrana plasmática (IM) pós-descongelamento e pós-percoll entre os grupos. Em relação às taxas de clivagem, observou-se que a P800 (34,5%) foi inferior aos grupos P200 (51,2%) e P500 (50,9%), não diferindo do controle (44,3%), (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação percentual e erro padrão da integridade de acrossoma (IA) e integridade de membrana (IM) após descongelamento e após gradiente de Percoll, de sêmen ovino congelado após submissão a diferentes intensidades de pressão negativa, bem como taxa de clivagem após FIV heteróloga com oócitos bovinos.

| GRUPOS | IAC | IAC (PÓS PERCOLL) | IM | IM (PÓS PERCOLL) | TAXA DE CLIVAGEM |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Controle | 55,4 ± 5.9 ^a | 46,4 ± 2.1 ^a | 36,6 ± 3 ^a | 45,4 ± 4.8 ^a | 44,3 ± 3.9 ^{a b} |
| P200 | 52,4 ± 2.6 ^a | 45,7 ± 1.8 ^a | 30,2 ± 2.6 ^a | 39,9 ± 2.2 ^a | 51,2 ± 5.4 ^a |
| P500 | 49,5 ± 3.1 ^a | 46,2 ± 2.6 ^a | 34,3 ± 3.1 ^a | 47,3 ± 4.2 ^a | 50,9 ± 2.9 ^a |
| P800 | 49,8 ± 5.1 ^a | 49,3 ± 4 ^a | 30,4 ± 3 ^a | 41,1 ± 4 ^a | 34,5 ± 5 ^b |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor (2014).

3.5 DISCUSSÃO

O efeito benéfico do emprego da pressão hidrostática positiva em sêmen de suínos e bovinos está descrito na literatura (PRIBENSKY *et al.*, 2006). Já o efeito do emprego da pressão negativa não havia sido testado em sêmen, mas demonstrou ser benéfico na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (MEZZALIRA *et al.*, 2010). Em função disso, neste estudo, a pressão negativa foi utilizada na tentativa de melhorar a criotolerância do sêmen ovino.

A inexistência de parâmetros para o emprego da pressão negativa, e com base em resultados prévios obtidos com embriões bovinos, optou-se pela utilização de três níveis de pressão negativa, 200, 500 e 800mBar, e um tempo de submissão de três minutos.

Em nosso estudo, logo após o descongelamento, a motilidade progressiva foi reduzida pelos três níveis de pressão negativa empregados (200, 500 e 800 mBar) em relação ao controle. Porém, nas avaliações mais tardias, realizadas durante o transcurso do TTR (1h, 2h e 3h) e após a submissão ao

gradiente de Percoll, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e os grupos submetidos à pressão. As três intensidades de pressão testadas tiveram desempenho semelhante quando avaliado pela motilidade progressiva dos espermatozoides no TTR, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma no pós descongelamento e pós Percoll, não diferindo do controle.

Supõe-se que os benefícios da submissão ao estresse controlado são determinados, ao menos em parte, por modificações na expressão gênica, modificação do mRNA após transcrição, modificações de proteínas por fatores pós transcricionais e indução e interação entre diversas proteínas e proteínas do DNA (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011). Os mecanismos envolvidos na formação de proteínas protetoras devem ser melhor estudados, principalmente em células espermáticas, para uma maior compreensão do efeito da pressão negativa nos mesmos. Os dados obtidos sugerem que logo após o descongelamento, não houve tempo suficiente para o desencadeamento dessas ações algo que foi superado ao decorrer do TTR, por isso mais estudos que compreendam os mecanismos de ação da pressão negativa são necessários.

Outro fator relevante foi a superioridade observada nos grupos P500 e P800 em manter a motilidade ao decorrer do TTR de 0h a 3h. Sendo este um fator positivo na manutenção da viabilidade espermática quando aplicada a pressão nestas duas intensidades.

Na avaliação da taxa de penetração espermática *in vitro* (clivagem), obtida pela formação de pró-núcleos, observou-se as pressões de 200 e 500mBar foram superiores ao grupo controle e a P800. Portanto a aplicação da pressão negativa de 800mBar mostrou-se prejudicial ao desenvolvimento embrionário, demonstrando não ser adequada pra o emprego no pré-congelamento de sêmen ovino.

As taxas de clivagem são um alicerce para a demonstração de um efeito benéfico da pressão negativa na criotolerância do sêmen ovino. Esse parâmetro *in vitro* é uma reconhecida metodologia usada para acessar a fertilidade *in vivo* do sêmen congelado ovino (GARCIA-ÁLVAREZ *et al.*, 2009). Avaliações *in vivo*, medidas pelas taxas de prenhez após inseminação com sêmen congelado, poderão indicar com mais precisão esse efeito. Desta forma, novos estudos são necessários para avaliar a viabilidade *in vivo* através das taxas de gestações após o uso do sêmen tratado por pressão negativa.

Com base nos dados obtidos, conclui-se que a pressão negativa de 500mBar é a mais adequada para uso no pré-congelamento de sêmen ovino,

não reduzindo a sua viabilidade após o congelamento e possibilitando elevada taxa de desenvolvimento embrionário após FIV heteróloga com oócitos bovinos. A pressão negativa de 800 mBar demonstrou ser nociva ao sêmen ovino, reduzindo sua capacidade de produzir embriões determinando 800mBar como pressão negativa excessiva e danosa para espermatozoides ovinos.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTINEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; SOLER, A.J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, p.643-650, 2009.

HENRY, M. E LEITE, R.C. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998.

KUO, Y. H.; PRIBENSZKY, CS.; E HUANG, S.Y. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen–thawed boar semen. **Theriogenology**. 70.2008.

LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.** Oct;24(2):197-204. 1989.

MEZZALIRA, J.C., OHLWEILER, L.U., URIO, M., NETO, S.G., MARINHO, L.S.R., ZAGO, F.C., FORELL, F., BERTOLINI, M., MEZZALIRA, A. Effect of Nitrocooler negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine in vitro-produced embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.1, p.210. 2010.

PRIBENSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; CSEH, S.; SOLTÍ, L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.143–150. 2005.

PRIBENSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A. E SZENCI, O. Hydrostatic pressure-induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.** 18, 162–163. 2006.

PRIBESZKY, C.S.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; KUTVOLGYI, G.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; DENG, J.; LEDERER, J. Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.181–182. 2007.

PRIBESZKY, C.S. e VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes and embryos performance. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p 48-55.2011.

SALAMON, S. E MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249. 1995.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, 46. p. 89-96.1997.

4 CAPITULO 2 PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO LIOFILIZADO AUMENTA A VIABILIDADE DE SÊMEN OVINO CONGELADO

Artigo a ser submetido a um periódico com corpo editorial

RESUMO

O uso de plasma seminal (PS) é promissor na proteção e reversão de danos celulares causados pela criopreservação. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição do PS liofilizado ovino (PSLO), bovino (PSLB) e equino (PSLE) ao diluente de congelamento do sêmen ovino. O PS foi obtido com vagina artificial (VA), centrifugado, liofilizado e submetido a dosagem de proteínas. O sêmen ovino foi obtido com VA (cinco carneiros da raça Lacaune) e diluído 1+3 em meio Tris-gema glicerolado sem PS liofilizado (controle TC), ou com 600µg/ml de proteínas de PSLO, PSLB e PSLE. Após o descongelamento foram avaliadas: motilidade progressiva (MP), MP após seleção por percoll (PP), e taxas de clivagem após a FIV heteróloga. O melhor tratamento (PSLE) e o controle foram avaliados através do sistema CASA quanto a cinética espermática, integridade de acrossoma (FITC-PSA), estabilidade de membrana (M540), integridade de cromatina (acridina orange), apoptose (anexina) e potencial de mitocôndria (mitotracker). Os dados foram avaliados por análise de variância e teste T com significância 5%. Após o congelamento, o PSLE (41,25%) e o PSLB (37,08%) apresentaram-se motilidade progressiva superior ao controle (31,25%), que não diferiu do PSLO (33,75%). Não houve diferença entre grupos quanto a MP-PP. Na clivagem, o grupo PSLE mostrou-se superior (71,37%) aos demais tratamentos (TC: 43,23%, PSLO:50% e PSLB: 53,98%). Observou-se diferença nos parâmetros VCL (TC-163,5µm/s, PSLE-186,2µm/s) e ALH (TC-9µm, PSLE-8,2µm) do CASA. Na citometria de fluxo o PSLE (38,9%) apresentou maior quantidade de células viáveis não apoptóticas e necróticas frente ao TC (32,1%). A adição de PSLE ao diluente de congelamento do sêmen ovino melhora os parâmetros de viabilidade pós-descongelamento (PD), podendo representar uma alternativa para a inseminação via cervical e a fecundação *in vitro* (FIV) com sêmen ovino congelado.

Palavras-chave: Criopreservação. FIV. inseminação cervical.

ABSTRACT

HETEROLOGOUS LYOPHILISATED SEMINAL PLASMA INCREASES SPERM VIABILITY IN FROZEN OVINE SEMEN

The use of seminal plasma (PS) is promising in protecting and reversing cell damage caused by cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the addition of ovine (PSLO), bovine (PSLB) and equine (PSLE) lyophilized PS to the freezing medium of ram semen. The PS was obtained by using an artificial vagina (AV), centrifuged, lyophilized and subjected to protein measurement. The ram semen was obtained with VA (five Lacaune ram) and diluted 1 +3 in Tris-yolk glycerol medium without lyophilized PS (TC control) or with 600µg/ml protein of PSLO, PSLB or PSLE. After thawing progressive motility (MP), MP after selection by percoll (PP), and cleavage rates after heterologous IVF were evaluated. The best treatment (PSLE) and control were evaluated using parameters of CASA, acrosome integrity (FITC-PSA), membrane stability (M540), chromatin integrity (acridine orange), apoptosis (annexin) and potential of mitochondria (Mitotracker). Data was submitted to analysis of variance and T test with 5% significance level. After freezing, the PSLE (41.25%) and PSLB (37.08%) were higher than the control motility (31.25%), which did not differ from PSLO (33.75%). There was no difference between groups regarding MP-PP. However, the PSLE group showed higher cleavage rate (71.37%) compared to the other treatments (TC 43.23%, PSLO 50% and PSLB 53.98%). Significant difference were observed in the parameters VCL (TC-163.5µm/s, PSLE-186.2µm/s) and ALH (TC-9.0µm, PSLE-8.2µm) of CASA. In flow cytometry the PSLE showed higher amounts of non-apoptotic and necrotic viable cells (38.9%) against TC (32.1%). The addition of PSLE to the freezing medium of ram semen improved post-thaw viability (PD) and may represent an alternative pathway for cervical insemination and *in vitro* fertilization (IVF) with frozen ram semen.

Keywords: cryopreservation, IVF, cervical insemination.

4.1 INTRODUÇÃO

O processamento do sêmen (diluição, incubação, resfriamento, congelamento e reaquecimento) produz uma inevitável redução da viabilidade espermática pós-descongelamento em virtude de alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais (WATSON *et al.*, 2000). Assim, são necessárias estratégias que prolonguem a viabilidade do sêmen congelado e que otimizem seu transporte através da tortuosa cérvix ovina, proporcionando índices de prenhez aceitáveis nas inseminações via cervical. A inseminação intrauterina por laparoscopia é a metodologia indicada para ser empregada com sêmen congelado ovino. Porém, esse método possui como entraves o alto custo do equipamento, as condições de infra-estrutura e principalmente a necessidade de profissionais altamente especializados (KERSHAW *et al.*, 2005).

O uso de plasma seminal homólogo apresentou resultados satisfatórios por sua atuação em diferentes mecanismos de preservação da sobrevivência espermática. Essas ações do plasma seminal podem ser verificadas através da identificação de proteínas e fatores antioxidantes capazes de conservar a integridade funcional da membrana celular e reverter injúrias oriundas de fenômenos como a peroxidação lipídica (MAWELL; WATSON, 1996; BALERCIA *et al.*, 2003) e choque térmico (BERGUER *et al.*, 1985; BARRIOS *et al.*, 2000). Segundo Lopez-Peraz (2012) a adição de plasma seminal ovino ao diluente tris gema teve um efeito benéfico nas taxas de prenhez em inseminação cervical com sêmen conservado a 5 graus Celsius, por 24h. Porém seu uso traz algumas restrições, como os riscos sanitários e o pequeno volume obtido em cada ejaculado.

Como forma de contornar esta limitação seria de interesse a utilização do plasma seminal heterólogo, que apresenta um alto grau de semelhança entre suas proteínas, especialmente entre bovinos e ovinos (THÉRIEN *et al.*, 1995; JOBIM *et al.*, 2005; BERGERON *et al.*, 2005). Todavia, também existem semelhanças entre bovinos e equinos (CALVETE *et al.*, 1997, BRANDON *et al.*, 1999). Martins et al (2013) relataram o efeito positivo da adição de plasma seminal heterólogo ao semen congelado ovino.

No entanto, o uso de plasma seminal *in natura* é limitado devido ao aumento do volume final da dose inseminante, com a conseqüente redução da concentração espermática, o que é limitante na IA cervical em ovinos. Uma

alternativa viável é o emprego da liofilização do plasma seminal heterólogo (CASALI, 2011) permitindo incorporação ao meio de congelamento com pouca alteração de volume. Como os relatos do emprego de plasma seminal liofilizado e uso do plasma heterólogo são escassos, é oportuna esta avaliação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição do PS ovino liofilizado (PSLO), bovino (PSLB) e equino (PSLE) ao diluente de congelamento do sêmen ovino, através de parâmetros seminais e da taxa de penetração espermática, buscando uma alternativa para a inseminação via cervical com sêmen ovino congelado.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do plasma seminal

Cinco garanhões, cinco touros e oito carneiros sexualmente maduros e compatíveis com os padrões Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY *et al.*, 1998) foram utilizados para obtenção de plasma seminal, através de coleta com vagina artificial na estação reprodutiva de cada espécie. Os ejaculados foram centrifugados, e o sobrenadante re-centrifugado até que não houvesse mais a formação de pellet (centrifugação a 5000 rpm). Em seguida foi constituído um *pool* com volumes proporcionais de plasma seminal (PS) de cada espécie. Posteriormente o *pool* de PS foi submetido à dosagem de proteínas totais em nanodrop e foi realizado o perfil proteico em gel de agarose. Os plasmas seminais foram liofilizados com liofilizador Christ Alpha 1-4 FreezeDryer.

4.2.2 Obtenção e congelamento do sêmen ovino

O sêmen para congelamento foi obtido de 5 carneiros da raça Lacaune (sexualmente maduros e com alimentação "ad libidum"), através de vagina artificial. Após avaliados os ejaculados constituíram um *pool*, que foi fracionado em 4 grupos diluídos 1+3 com Tris-gema glicerolado (EVANS; MAXWELL, 1987). Foram constituídos os seguintes tratamentos: TC: sem adição de plasma seminal, PSLO: adição de 600 µg de proteína de PS liofilizado ovino por mL de diluente, PSLB: adição de 600 µg de proteína de PS liofilizado bovino por mL de diluente e PSLE: adição de 600 µg de proteína de PS liofilizado equino por mL de diluente. As doses foram envasadas em

palhetas 0,25mL e uma concentração espermática em torno de 180 milhões de espermatozoides por palheta, o resfriamento e congelamento realizados no equipamento TK3000. As doses foram armazenadas em botijão criogênico.

4.2.3 Avaliação do sêmen após descongelamento

O experimento foi composto de oito rotinas de congelamento (repetições). Em cada repetição, duas palhetas foram avaliadas de cada um dos 4 grupos. Para aferição da viabilidade seminal pós-descongelamento avaliou-se a motilidade progressiva (MP) dos espermatozoides pós-descongelamento (PD) e pós percoll (MP-PP) de modo subjetivo. Os espermatozoides selecionados por percoll foram utilizados para FIV heteróloga segundo metodologia proposta por Garcia-Alvarez *et al.*, (2009) para seleção dos melhores tratamentos através da taxa de clivagem.

No segundo dia de cultivo (D0= FIV) os oócitos/zigotos foram avaliados quanto à taxa de clivagem. As estruturas foram fixadas em 400 µL de formol. Após fixação foram corados em 400 µL de álcool absoluto contendo 10 µL de Bisbenzimidide Thihydrochloride permanecendo neste meio por um período de 8 minutos. Logo após, foi adicionada uma gota de glicerol sob lâmina e lamínula, onde as estruturas em grupos (n=5) foram imersas, sendo visualizadas e avaliadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, America Inc., Sapporo, Japão), em filtro WU com excitações de 450-490nm e emissão 520nm em aumento de 1000x, para visualização, ou não, dos pró núcleos, masculinos e femininos.

Definida a melhor taxa de clivagem realizaram-se avaliações do melhor tratamento e do grupo controle. Foram avaliados parâmetros de cinética espermática com o auxílio de análise computadorizada (CASA) e de estrutura por citometria de fluxo.

4.2.3.1 Avaliações com o sistema CASA

As alíquotas para análises do sêmen pós-descongelamento foram diluídas em TRIS, mantendo uma concentração final de aproximadamente 48×10^6 espermatozoides/mL (DAVIS *et al.*, 1992) em seguida 6µL do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler[®] (Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel) aquecida a 37°C e submetida ao CASA (Hamilton

ThornMotilityAnalyser[®] - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA). Foram avaliados aleatoriamente três campos, nos seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

4.2.3.2 Avaliações por citometria de fluxo

As análises de integridade da membrana plasmática e reação acrossomal, quantificação de apoptose espermática, estabilidade e fluidez das membranas espermáticas, potencial de mitocôndria e ensaio da estrutura da cromatina espermática foram feitos por citometria de fluxo (Accuri C6[®] - Accuri Cytometers, Ann Arbor, USA) em 10.000 células de todas as amostras.

Para definir as populações espermáticas e/ou debris foram utilizados, com base em diferenças de tamanho e complexidade, o *Forward-Scatter-Cluster-Height* (FSC-H) e o *Side-Scatter-Cluster-Height* (SSC-H) no gráfico de pontos (CHEQUEMA *et al.*, 2012). Os dados fornecidos em pontos bidimensionais em uma escala logarítmica foram analisados pelo *software* CFlow Plus[®].

Integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal

Para a avaliação, uma alíquota de 1 μL de sêmen foi retirada e adicionada a 100 μL de TRIS em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL pré- aquecidos a 37°C. Em seguida foram adicionados a amostra 2 μL de iodeto de propídio (0,5mg/mL em solução salina isotônica) e 25 μL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA –100 $\mu\text{g/mL}$) (CELEGHINI *et al.*, 2007). Após 10 minutos de incubação a 37°C, o microtubo foi acoplado ao aparelho de citometria de fluxo Accuri C6[®] para realizar a leitura.

Quantificação de Apoptose espermática

Seguindo o protocolo do fabricante, foi utilizado um kit Anexina V-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) para detectar a translocação da

Fosfatidilserina (FS) dos folhetos interno e externo na membrana plasmática espermática do sêmen após a descongelamento (ANZAR *et al.*, 2002).

Avaliação da estabilidade e fluidez das membranas espermática.

Para a avaliação da estabilidade das membranas foi utilizado o fluocromo Yo-Pro 1 (25 μ M/mL de DMSO) e para a fluidez das membranas o fluocromo Merocianina 540 (M540-1mM/mL de DMSO), descrito por Hallap *et al.* (2006).

Foram utilizados 1 x 10⁶ espermatozoides/mL colocados em microtubos de fundo cônico de polipropileno contendo 5100 μ L de solução tampão TRIS, em seguida, foram acrescentados 1 μ L de Yo-Pro 1 e 2,6 μ L de M540, no qual foram incubados a 38°C por 10 minutos no escuro.

Avaliação do potencial de mitocôndria.

Para a avaliação, uma alíquota de 1 μ L de sêmen foi retirada e adicionada a 100 μ L de TRIS, em microtubos de 1,5 mL de polipropileno e fundo cônico, pré- aquecidos a 37°C. Em seguida, foram adicionados à amostra 2 μ L de iodeto de propídio (0,5mg/mL em solução salina isotônica) e 2 μ L de Mito-Tracker green FM (MITO) (Solução de trabalho- 1mM de MITO em DMSO, estocado a -20°C no escuro) (CELEGHINI *et al.*, 2007) e realizada a incubação a 37°C por 10 minutos.

Ensaio da estrutura de cromatina espermática (SCSA[®])

Segundo Everson (1994) este procedimento mede a susceptibilidade do DNA na cromatina do espermatozoide para a desnaturação induzida por ácido. Espermatozoides são expostos a solução ácida e depois são corados com acridine orange (AO). Quando a dupla fita de DNA fluoresce em verde o resultado é considerado normal, e quando uma fita simples emite fluorescência vermelha, o DNA é considerado desnaturado.

Após a descongelamento uma alíquota do sêmen foi diluída em solução TNE (0,15M de NaCl, 0,01M TRIS HCl, 1mM EDTA, pH = 7,4) deixando em uma concentração de 2 x 10⁶ SPTZ/mL. Adicionou-se 200 μ L de sêmen em 400 μ L de solução detergente/ácida (0,1% Triton X-100, 0,08N HCl e 0,15M NaCl, pH=1,4). Depois de 30 segundos, adiciona-se 1,2mL de solução do fluocromo AO (6 μ g/mL, em tampão – 370mL de água destilada com 0,1M de ácido cítrico monohidratado; 630mL de água destilada com 0,2M de Na₂HPO₄ dibásico, mistura as duas soluções e acrescenta 0,372g de EDTA dissódico e

8,77g de NaCl – pH=6,0). Todos os passos foram feitos a 4°C e a leitura em citometria foi realizado após 3 minutos da colocação da AO.

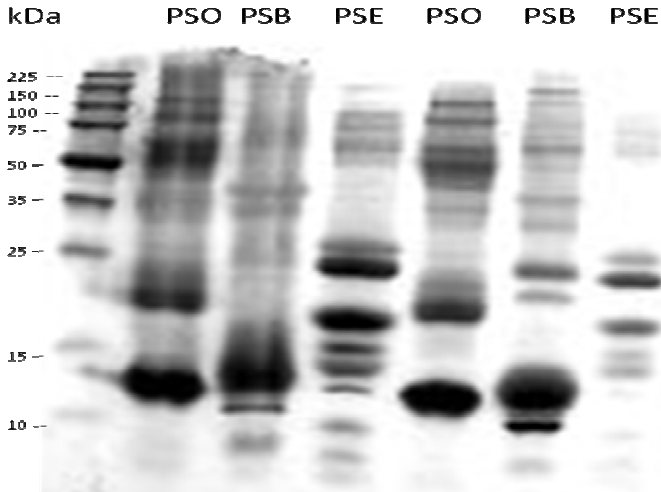
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados motilidade após descongelamento, motilidade após percoll, clivagem, MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, PCT, integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal, quantificação de apoptose espermática, avaliação da estabilidade e fluidez das membranas espermática, avaliação do potencial de mitocôndria e ensaio da estrutura de cromatina espermática (SCSA[®]) foram avaliados por análise de variância, teste T a significância 5% por o programa estatístico JMP.

4.4 RESULTADOS

A dosagem de proteínas totais definiu a quantidade necessária de plasma seminal que determinasse uma concentração final de 600µg de proteína por mL de diluente de congelamento. O plasma seminal ovino continha 83,60µg de proteína por mg de liofilizado, o bovino 122,9µg e o equino 84,8µg. As bandas proteicas encontradas no gel de agarose são apresentadas na figura 1.

Figura 1: Bandas proteicas presentes no plasma seminal ovino (PSO), bovino (PSB) e equino (PSE) indicadas por peso molecular em kDa.



Fonte: Próprio autor (2014)

No pós-descongelamento o maior percentual de motilidade progressiva (MPPD) foi observado com PSLE, que foi semelhante ao tratamento TRIS+PSLB. De forma surpreendente, e contrastando com PSB e PSE, o tratamento PSLO não melhorou a MPPD, não diferindo do grupo controle. Na avaliação procedida após submissão ao Percoll, todos os grupos apresentaram idêntica motilidade progressiva, evidenciando a efetividade da técnica na seleção dos espermatozoides ovinos, após a criopreservação. Já na taxa de clivagem, observou-se um incremento do grupo PSLE, que foi superior aos demais tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Percentuais médios e erro padrão de viabilidade espermática avaliados pela motilidade progressiva pós descongelamento (MP-PD) e pós percoll (MP-PP), assim como taxas de clivagem após FIV heteróloga, com sêmen ovino congelado em TRIS sem adição de plasma seminal (TC), ou com a adição de plasma seminal liofilizado ovino (PSLO), bovino (PSLB) ou equino (PSLE).

| Parâmetro % | TRIS (TC) | TRATAMENTOS | | |
|----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | TRIS+PSLO | TRIS+PSLB | TRIS+PSLE |
| MP-PD | 31,25±1,8 ^c | 33,75±1,5 ^{bc} | 37,08±1,5 ^{ab} | 41,25±1,7 ^a |
| MP-PP | 45,83±2,4 ^a | 47,08±2,8 ^a | 47,91±2,4 ^a | 53,91±4,3 ^a |
| Clivagem | 43,23±3,2 ^b | 50±2,1 ^b | 53,98±4,1 ^b | 71,37±2,9 ^a |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Fonte: Próprio autor (2014)

Quanto aos parâmetros do CASA, observou-se que o PSLE proporcionou maior valor de VCL (186,2 vs 163,5 $\mu\text{m/s}$) e menor ALH (8,2 vs 9 μm), como demonstrado na tabela 2. Observou-se ainda uma tendência ($p=0,0690$) de superioridade do PSLE quanto a VAP em relação ao controle.

Tabela 2: Valores de velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) e frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz) e seus respectivos erros padrão em sêmen ovino congelado em Tris (Cont) e Tris adicionado de plasma seminal equino liofilizado (PSLE).

| Grupos | VAP | VSL | VCL | ALH | BCF |
|--------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| CONT | 87,5±3,9 ^a | 69,3±3,4 ^a | 163,5±8,1 ^a | 9,0±0,3 ^a | 31,5±1,3 ^a |
| PSLE | 95,8±3,8 ^{a*} | 76±4,5 ^a | 186,2±6,4 ^b | 8,2±0,2 ^b | 30,3±1,4 ^a |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) * $P=0,069$.

Fonte: Próprio autor (2014)

Já nos demais parâmetros avaliados (MT, MP, STR e LIN) não foi observada diferença entre o grupo controle e o grupo PSLE (Tabela 3),

Tabela 3: Valores percentuais e erro padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) de sêmen ovino congelado em Tris (Cont) e Tris adicionado de Plasma seminal equino liofilizado (PSLE).

| Grupos | MT | MP | STR | LIN |
|--------|----------|----------|----------|----------|
| CONT | 54,4±4,2 | 22,3±3,1 | 75,9±1,3 | 42,6±1 |
| PSLE | 56,5±3 | 25,3±3 | 75,9±1,7 | 40,4±1,4 |

(P>0,05)

Fonte: Próprio autor (2014)

Quanto aos dados de citometria, observou-se diferença na quantificação de Apoptose espermática por anexina, com o grupo PSLE apresentando maior quantidade de células viáveis não apoptóticas e necróticas (38,9%), em relação ao grupo controle (32,1%) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores em percentagem de apoptose espermática por anexina, indicando em porcentagem células necróticas, células viáveis e células apoptóticas e respectivos erros padrão de sêmen ovino congelado em Tris (Cont) ou Tris adicionado de Plasma seminal equino liofilizado (PSLE).

| | NECRÓTICAS | VIÁVEIS | APOPTÓTICAS |
|------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| CONT | 66,9±2,6 ^a | 32,1±3,6 ^a | 0,09±0,7 ^a |
| PSLE | 61,1±4,1 ^b | 38,9±4,1 ^b | 0,04±0,01 ^b |

Letras diferentes na mesma coluna, indicam diferença estatística (P<0,05)

Fonte: Próprio autor (2014)

Na integridade da membrana plasmática e membrana acrossomal não reagida (FITC-PSA) não foi observada diferença para os grupos controle (22,1%±1,6) e PSLE (24,1%±1,3). Na avaliação da estabilidade e fluidez da membrana espermática por YOPRO e M540, não foram verificadas diferenças entre os percentuais de estáveis (26,1±2,7 vs 28,3±2,3) para os grupos controle e PSLE, respectivamente. Da mesma forma, não foi verificada influência de PSLE no potencial de mitocôndria por Mitotracker, sendo observados os

mesmos valores para alto potencial ($72,1\% \pm 2,9$) e baixo potencial ($27,9\% \pm 2,2$) para ambos os grupos.

Finalmente, no ensaio da estrutura de cromatina espermática (SCSA) por Acridine Orange, foram observados índices semelhantes de íntegros ($95,11\%$ vs $95,12\%$) e DFI (DNA fragmentation INDEX) ($4,89\%$ vs $4,88\%$) para os grupos controle e PSLE.

4.5 DISCUSSÃO

O processo de congelamento reduz a viabilidade espermática em virtude de alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais (WATSON, 2000). Isto é mais evidente com o sêmen ovino. A adição de plasma homólogo ao sêmen já foi descrita, com resultados positivos na fertilidade. As ações benéficas do PS se devem, provavelmente, a proteínas e fatores antioxidantes capazes de conservar a integridade funcional da membrana celular e reverter injúrias como a peroxidação lipídica (MAXWELL; WATSON, 1996; BALERCIA *et al.*, 2003) e o choque térmico (BERGUER *et al.*, 1985; BARRIOS *et al.*, 2000).

Entraves do uso do plasma seminal como o aumento do volume da dose inseminante, e no caso de ovinos, o reduzido volume obtido, instigaram estudos com o uso de plasma seminal heterólogo. Martins *et al.* (2013) demonstraram viabilidade do uso de plasma seminal de espécies com ejaculado de maior volume, como os equinos, evidenciando o efeito positivo da adição de plasma seminal heterólogo ao sêmen congelado ovino.

Neste estudo relata-se o emprego de PS heterólogo liofilizado como aditivo no congelamento de sêmen ovino. A liofilização permite a incorporação do PS sem a indesejável redução da concentração espermática na dose inseminante. Além disso, a quantificação das proteínas do PS liofilizado permite a padronização da sua adição, produzindo resultados mais homogêneos. Ainda, o uso do PS heterólogo, além da maior facilidade de obtenção, reduz o risco de transmissão de enfermidades espécies-específicas.

Existe uma semelhança nas proteínas do PS, especialmente entre bovinos e ovinos (THÉRIEN *et al.*, 1995; JOBIM *et al.*, 2005; BERGERON *et al.*, 2005). Da mesma forma, também é observada semelhança entre as proteínas do PS de bovinos e equinos (CALVETE *et al.*, 1997; BRANDON *et al.*, 1999). Todavia, o grau de semelhança entre as proteínas do PSO e PSE não

é tão evidente. Mesmo assim, foi observado um evidente efeito positivo da adição de plasma seminal equino ao sêmen congelado ovino. Isto demonstra que a homologia entre as proteínas do PS não é essencial para a proteção aos espermatozoides. O primeiro experimento demonstrou uma clara evidência do efeito benéfico da adição de PS liofilizado no pré congelamento do sêmen ovino. Na avaliação da MP pós descongelamento o PSLE mostrou superioridade. Já na avaliação das taxas de clivagem, observou-se um efeito positivo do PSLE. Curiosamente, o PS equino, embora com a menor homologia, foi o que proporcionou maior taxa de clivagem (71,3%), em relação ao PSO (50%) e PSB (53,98%).

Estes dados são significativos já que a fertilização *in vitro* (FIV) demonstra a habilidade fertilizante do espermatozoide (SMITH; MURRAY, 1996), demonstrando que o sêmen congelado com PSLE apresenta uma maior capacidade de penetração nos oócitos. Smith *et al.* (1998) e Garcia-Alvarez *et al.* (2009) encontraram correlação entre a fertilidade *in vivo* após inseminação por laparoscopia, com a taxa de clivagem *in vitro*. A maior taxa de clivagem do PSLE indica que a ação das proteínas do plasma seminal podem não ser tão específicas quanto o relatado anteriormente por Garcia-Lopez *et al.* (1996). Todavia, é possível também que os efeitos benéficos possam ser devidos à proteínas específicas que estejam presentes nos distintos PS. Evidências experimentais sugerem que a Osteopontina (Proteína do plasma de Touros) afeta a ligação esperma-oócito (MOURA *et al.*, 2005). Essa proteína também foi localizada no plasma seminal equino, como uma proteína positiva do plasma (72 kDa, osteopontina), podendo ser uma determinante dos resultados encontrados.

Em função do superior efeito benéfico do PSLE, em relação ao PSLO, PSLB e controle, observado no primeiro experimento, as demais avaliações foram procedidas comparado apenas o PSLE e o grupo controle.

O sêmen congelado dos dois grupos (controle e PSLE) foi avaliado pelo sistema CASA. Superioridade do PSLE foi observada no parâmetro VCL o qual indica na velocidade curvilinear, a velocidade real do espermatozoide e uma tendência ($P=0,0690$) na VAP (distância do trajeto). A motilidade é um dos parâmetros mais importantes utilizados para avaliação da qualidade espermática, fornecendo informações importantes no estado de energia dos espermatozoides. A motilidade é essencial para o espermatozoide alcançar o

local da fertilização (YÁÑIZ *et al.*, 2000, 2006). Ainda, foi verificado menor ALH do grupo PSLE em relação ao controle.

A maior viabilidade espermática proporcionada pela adição de PSLE ainda foi evidenciada pela maior quantidade de células viáveis não apoptóticas e necróticas em relação ao grupo controle, demonstrando a maior viabilidade e longevidade do sêmen tratado com PSLE.

Nas avaliações de integridade de acrossoma, da estabilidade e fluidez das membranas espermáticas, na estrutura de cromatina espermática e no potencial de mitocôndrias, não foram evidenciados efeitos da adição de PSLE, demonstrando a sua inocuidade nestes parâmetros.

A adição de plasma seminal (PS) heterólogo, principalmente o PSLE, ao diluente de congelamento do sêmen ovino melhora sua viabilidade pós-descongelamento (PD) e proporciona maiores taxas de clivagem após FIV heteróloga com oócitos bovinos, evidenciando uma maior capacidade de penetração dos espermatozoides tratados. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o PSLE pode ser uma alternativa para viabilizar aplicação de biotecnologias em ovinos como inseminação artificial cervical com sêmen congelado, produção *in vitro* e *in vivo* de embriões e melhorar as taxas já obtidas em laparoscopia.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology Reproduction**.v.66, p.354–360,2002.

BALERCIA, G.; ARMENI, T.; MANTERO, F.; PRINCIPATO, G.; REGOLI, F. **Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells.***Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 41, p. 13–19, 2003.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane.**Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531–1537, 2000.

BARRIOS, B.; FERNANDEZ-RUAN, M.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, 26: 539–549.2005.

BERGER T. E CLEGG E. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock. Initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. **J Anim Sci.**:60:1295-1302. 1985.

BERGERON,A.; VILLEMURE, M.; LAZURE,C.; MANJUNATH, P.Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Cell Biology and Biochemistry**, v. 71, p. 461-470, 2005.

BRANDON, C.I.; HEUSNES, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, 52: 863-873. 1999.

CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L. E TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS letters** Volume 407, Issue 2, p. 201-206. 1997.

CASALI, R. ; ZAGO, C.,F. ; FEDERLE, M. ; DRUM, J.,N. ; SPONCHIADO, M. ; KLEIN, N. ; ZANETTI, M., S. ; GAUDENCIO NETO, S ; MEZZALIRA, ALCEU ; COSTA, U.,M. ; VIEIRA, A.,D. Lyophilized Seminal Plasma Improves the Motility of Frozen Ram Semen and Increases the cleavage in heterologous IVF. In: SBTE, 2011, Fortaleza. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 356-356. 2011.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**.v.42, p. 479-488, 2007.

CHEQUEMA, C.; BRAVO, P.; TREULE, F.; GIOJALAS, L.C.; VILLEGAS, J.; SANCHEZ, R.; RISOPATRO, J. Sperm Membrane Functionality in the Dog Assessed by Flow Cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**. v.47, p.39–43, 2012.

DAVIS, R.O.; ROTHMANN, S.A.; OVERSTREET, M.D. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. **Fertility and Sterility**, V.57, n.3, p.648-653, 1992.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Salamon's Artificial **Insemination of Sheep and Goats**, Sydney: Butterworths, 99. 1987.

EVENSON, D.P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. , 41:637-651.1994.

GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; SOLER, A. J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, p.643-650. 2009.

GARCIA-LOPEZ, N., OLLERO, M., CEBRIAN-PEREZ, J.A., MUINO-BLANCO, T. Reversion of thermic-shock effect on rem spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 680,p. 137-143. 1996.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, Ü.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use fullness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**.v.65, p.1122-1133, 2006.

HENRY, M. E LEITE, R.C. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998.

JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., SALBEGO, C.G., WALD, V.B., HORN, A.P. E MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma.

Theriogenology63,p.2053–2062. 2005.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; SUKANYA LEETHONGDEE, K.I.; WAX, G. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225–1235. 2005.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET,R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. **Theriogenology**., v. 77, p. 395–399. 2012.

MARTINS, L.T., SANTOS NETO, P.C., GAUDÊNCIO NETO, S., VIEIRA, F.K., RIBEIRO, E.S., MEZZALIRA, A., VIEIRA, A.D. Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm. **Anim. Reprod.**, v.10, n.4, p.697-703. 2013.

MAXWELL W. M. C., WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen.**Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55–65, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; GRAAF, S.P.; GHAOUI, R.E.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility.Reproduction in domestic ruminants VI. **Proceedings of the Seventh International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants**, Wellington, New Zealand, 13-17,p. 13-38. 2007.

MENARD, M.; NAUC, V.; LAZURE, C.; VAILLANCOURT, D. E MANJUNATH, P. Novel Purification Method for Mammalian Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Reveals the Presence of a Novel Member of This Family of Protein in Stallion Seminal Fluid. **Molecular Reproduction and Development**, 66. p.349–357.2003.

MOURA, A.A.Seminal plasma proteins ad fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Anim. Reprod.**, v.2 n.1, p.3-10, 2005.

SMITH, J.F. e MURRAY, G.R. Use of bovine oocytes for the evaluation of ram semen. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, vol 56. p.304-306. 1996.

SMITH, J.F.; PARR, J.; MURRAY, G.R.; CLARKE, A.G.; McDONALD, R.M.; DUGANZICH, D.M. Relationship between laboratory measures of ram sperm competence and field fertility. **Proc N Z SocAnim Prod**; 58. p.181-5. 1998.

THERIEN, I.; BERGERON, A.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Mol. Reprod. Dev.** v.71, p.97-106. 2005.

YÁNIZ, J.L.; LOPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H. Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. **Anat. Histol. Embryol.** 35, p.28-34. 2006.

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

5 CAPÍTULO 3 INSEMINAÇÃO CERVICAL PROFUNDA POR CATETERIZAÇÃO DA CÉRVIX.

5.1 INTRODUÇÃO

Na espécie ovina é possível realizar inseminação vaginal, intracervical, transcervical e por laparoscopia. As duas primeiras só apresentam taxas de prenhez aceitáveis se for utilizado sêmen fresco ou refrigerado (CSEH *et al.*, 2012). Isto ocorre pelas alterações que a criopreservação causa nos espermatozoides, associado a condição anatômica do cérvix da ovelha.

A técnica transcervical é limitada devido a disposição dos anéis do colo ovino, o qual geralmente impossibilita a passagem da pipeta IA para o corpo do útero (EVANS *et al.*, 1987), limitando a difusão da técnica de inseminação artificial e transferência de embrião por esta via (AUDICANA, *et al.*, 1998). O colo do útero ovino é um órgão tubular longo, fibroso composto predominantemente de tecido conjuntivo com uma camada serosa exterior e epitélio luminal interior. O lúmen é altamente tortuoso, devido à presença de 4 a 7 anéis cervicais (FUKUI, *et al.*, 1978).

Richardson *et al.* (2012) não encontrou diferença em taxas de prenhez no uso de inseminação vaginal versus cervical, porém encontrou correlação positiva da profundidade de penetração cervical com as taxas de prenhez, instigando novas investigações. O local da inseminação quando usado o sêmen congelado tem um efeito importante sobre a taxa de prenhez, com maiores taxas obtidas após inseminação por laparoscopia ou transcervical (WULSTER-RADCLIFFE *et al.*, 2004).

Segundo Wulster-Radcliffe *et al.* (2004), existem dois evidentes métodos para driblar as características físicas da cérvix ovina; alinhar a cévix e aumentar o diâmetro do lúmen, ou projetar um aplicador que acompanhe essa tortuosidade. Kershaw *et al.* (2005) relata ser promissor o desenvolvimento de pipetas de IA que superem o lúmen cervical permitindo penetração, o que aumentaria taxas de prenhez com sêmen congelado na inseminação por via cervical. Megan *et al.* (2004) criou um cateter que permitia uma deposição mais a frente do sítio de deposição cervical, porém não foi observada melhora nas taxas de prenhez com esse método. Alvarez *et al.* (2012) testando 4 diferentes cateteres concluiu que o uso de um cateter CAT06 (com 0,6 centímetros da parte distal curvas com um ângulo de 30°) possibilita uma

maior penetração do colo do útero, com melhora na fertilidade de ovelhas Churra e Assaf, após a inseminação.

A aplicação bem sucedida de IA depende da disponibilidade de uma técnica de inseminação barata e eficaz, utilizando sêmen congelado (RICHARDSON *et al.*, 2012). O objetivo deste estudo foi avaliar as taxas de prenhez após inseminação artificial com uma técnica de pinçamento do fundo de saco vaginal e tração da cévix para cateterização da mesma com um aplicador comercial (Alta genética®), em comparação com a deposição cervical superficial do sêmen.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o trabalho, cinquenta ovelhas foram sincronizadas e inseminadas. Os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização de cio, sendo utilizado o bloqueio progesterônico com aplicação no 10º dia de eCG (300 UI) e prostaglandina (0,125 mg) com retirada do pessário vaginal no 12º dia de implante (ABECIA *et al.*, 2012). A técnica de rufiação foi realizada após 12h da retirada do pessário vaginal e a inseminação 12h após a observação do cio.

Os animais foram divididos em 2 grupos onde 27 foram inseminados por via cervical superficial (o sêmen era depositado na entrada do cévix) e 23 por via cervical profunda, com pinçamento do fundo de saco vaginal e cateterização cervical. Foram utilizados para as práticas dois aplicadores específicos para espécie ovina (Figura 2), possibilitando a deposição do sêmen na entrada da cévix quando realizada a IA cervical superficial e a partir do terceiro anel cervical quando empregada a IA cervical profunda, com pinçamento do saco vaginal e tracionamento da cévix.

Para ambas as técnicas os animais eram contidos com a ajuda de um tronco de contenção, no qual inicialmente o animal ficava em posição quadrupedal e posteriormente era inclinado em um ângulo de 45º em relação ao solo, de forma que os membros caudais ficavam elevados em relação a cabeça.

Após a contenção da fêmea, para técnica de IA cervical profunda o inseminador inseria um espéculo previamente lubrificado e em seguida, após localização da cévix, era borrifado spray de lidocaína, antes de realizar o pinçamento dos tecidos adjacentes com duas pinças de Allis. Após o pinçamento, procedia-se a tração dos mesmos, aproximando a cévix do orifício vaginal (Figura 2). Com os dedos indicador e polegar, realizava-se a manipulação da cévix para a introdução do aplicador seguida da inseminação

propriamente dita. Para a técnica de IA superficial, era inserido um espéculo previamente lubrificado e, após localização da cérvix, com o auxílio do aplicador realizava a deposição do sêmen na entrada da cérvix. As ovelhas eram inseminadas por uma das técnicas, alternadamente.

O sêmen utilizado para ambas as técnicas de IA, foi coletado com vagina artificial de 4 carneiros das raças Lacaune e Milchshaff e diluído na proporção 1+3 em Tris gema. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, previamente identificadas e submetidas ao resfriamento em equipamento (TK3000 Compact). A curva de resfriamento consistiu na queda de 0,5°C por minuto, partindo da temperatura ambiente até atingir 5°C.

Após o período de 30 dias os animais foram submetidos ao exame de ultrassonografia via transretal com transdutor linear 7,5Mhz (ISHWAR, 1995) para detecção de prenhez.

Figura 1: Foto ilustrativa dos pistolestes utilizados na IA superficial (esquerda) ou profunda (direita) de ovelhas



Fonte: Próprio autor (2014)

Figura 2: Foto ilustrativa do pinçamento de tecidos e exteriorização da cérvix, na IA profunda em ovelhas



Fonte: Próprio autor (2014)

Os dados obtidos das taxas de prenhez foram comparados pelo teste χ^2 (planilha Excel, Microsoft®), com nível de significância de 5%.

5.3 RESULTADOS

A inseminação cervical superficial proporcionou uma taxa de prenhez de 33,3%, que não diferiu da cervical profunda 52,2% (Tabela 1).

Tabela 1: Taxas de prenhez após inseminação com sêmen resfriado, por via cervical superficial, ou cervical profunda e intrauterina em ovelhas.

| | PRENHES | VAZIAS | TAXA PRENHEZ |
|-------------|---------|--------|--------------|
| SUPERFICIAL | 9 | 18 | 33,3% |
| PROFUNDA | 12 | 11 | 52,2% |

Fonte: Próprio autor (2014)

Na execução do trabalho pode-se observar que existe uma grande variação na progressão do cateterismo cervical, após o pinçamento. Das 23 fêmeas utilizadas com a IA profunda, foi possível transpor totalmente a cérvix em nove animais, porém a inseminação profunda (a frente do terceiro anel cervical) sempre foi possibilitada com a nova técnica. Todavia, embora o número de animais seja reduzido, a taxa de prenhez observada nas fêmeas com cateterismo total da cérvix, não foi diferente (55,5%) da observada nas fêmeas com IA profunda (50%). Foi observado que a técnica de pinçamento do fundo de saco vaginal e cateterização cervical evitou o refluxo que normalmente ocorre na inseminação cervical superficial. Alvarez (2000) observou na raça Churra que a fertilidade era significativamente maior quando o refluxo foi nulo (42,78%) em comparação com refluxo parcial (31,02%).

Embora não tenha sido possível demonstrar diferença estatística entre os dois tratamentos, existe uma considerável variação numérica entre os grupos, indicando uma diferença que é significativa a 0,9%, demonstrando que provavelmente o número de animais (n=50), foi insuficiente, tornando necessário aumentar o número para obter conclusões mais apuradas.

5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Hormonal control in reproduction in small ruminants. **Animal reproduction Science**, 130. p. 173-179.2012.

ÁLVAREZ M. **Study of the cervix in Churra sheep as a method of improving artificial insemination via the vaginal route**. Doctoral Thesis, Veterinary Faculty, University of León, Spain. 2000.

ÁLVAREZ, M.; CHAMORRO, C.A.; KAABI, M.; ANEL-LÓPEZ, L.; BOIXO, J.C.; ANEL, L. ANEL, P. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. **Animal Reproduction Science** 131, p. 153– 159.2012.

AUDICANA, L. ; AUGHEY, E. ; O’SHAUGHNESSY, P. J. Sensitivity of the early luteal phase ovine cervix to prostaglandin E2 (PGE2) and expression of EP3 receptor mRNA. **Research in Veterinary Science**, 64, p.177-179.1998.

CSEH, V.; FAIGL, G.S.; AMIRIDIS, S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, 130, p. 187– 192. 2012.

FUKUI, Y.; ROBERTS, E. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**; 10, p.381–93. 1978.

ISHWAR, A.K. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research** 17. p. 37-44. 1995.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; SUKANYA LEETHONGDEE, K.I.; WAX, G. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225–1235. 2005.

MARTINS, L.T., SANTOS NETO, P.C., GAUDÊNCIO NETO, S., VIEIRA, F.K., RIBEIRO, E.S., MEZZALIRA, A., VIEIRA, A.D. **Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm**. *Anim. Reprod.*, v.10, n.4, p.697-703. 2013

MEGHAN, C.; WULSTER-RADCLIFFE, S.; WANG, G.; LEWIS, S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, 62, p. 990–1002. 2004.

RICHARDSON, L.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A.; MARTÍ, J.I.; FAIR, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Effect of site of deposition on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, 131, p.160– 164. 2012.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; WANG, S.; LEWIS, G.S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology** 62, 990–1002. 2004.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As particularidades na espécie ovina que dificultam a disseminação de biotécnicas reprodutivas instigam a busca por técnicas que aumentem a qualidade seminal, conseqüentemente a fecundação, e superem a anatomia da cérvix ovina. Os experimentos realizados tiveram como objetivo transpor estes obstáculos.

O primeiro experimento definiu a pressão negativa de 500mBar como a mais adequada para o emprego no pré-congelamento de sêmen ovino. Este dado possibilitara a utilização deste tipo de estresse controlado em novos momentos e por diferentes tempos, possibilitando melhorar a criotolerância do sêmen ovino. Novas investigações são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos na formação de proteínas protetoras em células espermáticas. Igualmente significativo foi demonstrar que o sêmen ovino submetido à pressão negativa não é acometido de injúrias e possibilita elevadas taxas de produção embrionária após FIV heteróloga. Torna-se importante novos estudos que avaliem esta metodologia *in vivo*, verificando as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen tratado, bem como possibilitem avaliar a associação desta metodologia com outras, como a adição de plasma seminal liofilizado.

O segundo experimento descreve o emprego de PS heterólogo liofilizado, como aditivo no congelamento de sêmen ovino. A adição de PSLE ao diluente de congelamento do sêmen ovino melhorou os parâmetros de viabilidade pós-descongelamento e proporcionou maiores taxas de clivagem após FIV heteróloga com oócitos bovinos, evidenciando uma maior capacidade de penetração dos espermatozoides tratados. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o PSLE pode ser uma alternativa para viabilizar a inseminação artificial cervical com sêmen ovino congelado.

O terceiro experimento, mesmo não demonstrando diferenças entre as técnicas com a significância de 5%, mostrou que o pinçamento do fundo de saco vaginal pode ser uma alternativa para técnica de IA transcervical em ovinos. A cateterização da cérvix evitou o refluxo que normalmente ocorre na inseminação cervical superficial, sendo possível que associada às metodologias propostas nos experimentos anteriores, possa melhorar as taxas de prenhez após inseminação de ovelhas com sêmen congelado.

O protocolo de congelamento com os aditivos propostos, associado ao método de inseminação cervical profunda, deverá ser investigado. Uma

adequada metodologia de IA possibilitara melhorar o padrão zootécnico e produtivo do rebanho ovino do País, com possibilidade de disseminação de uma genética apurada, através de uma metodologia de baixo custo e fácil aplicabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ÁLVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., KAABI, M., ANEL-LÓPEZ, L., BOIXO, J.C., ANEL, E., ANEL, L., DE PAZ, P. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, 131, p.153– 159. 2012.

BAILEY, J.L. BLODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J Androl**, 21, p.1–7.2000.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531–1537, 2000.

BARRIOS, B.; FERNANDEZ-RUAN, M.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PÉREZ, J.A. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, 26, p. 539–549.2005.

BERNARDINIA, A., HOZBORA, F., SANCHEZA, E., FORNÉSC, M.W., ALBERIOA, R.H., CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, 76,p.436–447.2011.

BRAUNDMIEIER, A.G. E MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **JDairy Sci**, 84, p.1915-1925. 2001.

BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; UCCHEDDU, S.; SRTINA, A.; ROSATI, I.; ZEDDA, M.T.; LEDDA, S. High hydrostatic pressure treatment improves the quality of in vitro-produced ovine blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.1, p. 202. 2010.

BUCAK, M.N.; ATES, A.; YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134. 2008.

BURNAUGH, L.; BALL, B.A.; SABEUR, K.; THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 249-260, 2010.

DOMÍNGUEZ, M.P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R.H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p 564–573, 2008.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.359–368, 2004.

DU, Y.; PRIBENSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; KUWAYAMA, M.; PEDERSEN, A.M.; VILLEMOS, K.; BOLUND, L.; VAJTA, G. High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. **Reproduction Research**, v.135, p.13-17, 2008.

EL-HAJJ GHAOUI, R.; THOMSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. The origin of membrane vesicles in ram seminal plasma. **Reprod. Domest. Anim.**, v.41, p.98-105, 2006.

EL-HAJJ GHAOUI, R.; GILLAN, L.; THONSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **J. Androl.** v.28, p.109-122, 2007.

EVANS, G.; MCPHIE, C.; MAXWELL, W.M.C. **The effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa.** Proceed 14th International Congress on Animal Reproduction. v.2, p.74, 2000.

GILLIAN, L. E MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **J. Reprod. Féertil. Suppl.**, v.54, p. 271-283, 1999.

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

GUSTAFSSON, B.K., GRAHAM, E.F., CRABO, B.G., PAVELKO, M.K., WAGNER, W.C. Pre-freeze supplementation of ram semen with PGE1 and PGF2 alpha: effects on sperm vitality in vitro and on sperm transport in the ewe. **In: Proceedings Annual Meeting Society Study Reproduction**, (Abstract #10).1977.

HUANG, S., PRIBENSZKY, C., KUO, Y., TENG, S., CHEN, Y., CHUNG, M. E CHIU, Y. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing–thawing. **Animal Reproduction Science.** v.87, p.143-150, 2009.

JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., SALBEGO, C.G., WALD, V.B., HORN, A.P. E MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, 63, p. 2053–2062. 2005.

KARESKOSKI, M. E KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science** 107, p. 249–256, 2008.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; SUKANYA LEETHONGDEE, K.I.; WAX, G. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225–1235, 2005.

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

LEAHY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.571-578, 2009.

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

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J.I.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.67, p.1446-1454, 2007.

MARTINS, L.T., SANTOS NETO, P.C., GAUDÊNCIO NETO, S., VIEIRA, F.K., RIBEIRO, E.S., MEZZALIRA, A., VIEIRA, A.D. Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm. **Anim. Reprod.**, v.10, n.4, p.697-703. 2013.

MAXWELL, W.M.C; WELCH, G.R. E JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **ReprodFertilDevel.**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; MORTIMER, S.T.; GILLAN, L.; GELLATLY, E.S.; MCPHIE, C.A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.** v.11, p.123-126, 1999.

MAXWELL, W.M.C.; GRAAF, S.P.; GHAOUI, R.E.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility.**Reproduction in domestic ruminants VI**. Proceedings of the Seventh International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, Wellington, New Zealand, v. 13, n.17 . p. 13-38, 2007.

MENARD, M.; NAUC, V.; LAZURE, C.; VAILLANCOURT, D. E MANJUNATH, P. Novel Purification Method for Mammalian Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Reveals the Presence of a Novel Member of This Family of Protein in Stallion Seminal Fluid. **Molecular reproduction and development**, v. 66, p.349–357, 2003.

MEZZALIRA, J.C., OHLWEILER, L.U., URIO, M., NETO, S.G., MARINHO, L.S.R., ZAGO, F.C., FORELL, F., BERTOLINI, M., MEZZALIRA, A. Effect of Nitrocooler negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine in vitro-produced

embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.1, p.210, 2010.

MORTIMER, S.T. E MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.127, p.285-291, 2004.

MOURA, A.A.Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Anim. Reprod.**, v.2 n.1, p.3-10, 2005.

MOURA, A.A., CHAPMAN, D.A., KOC, H., KILLIAN, G.J. Proteins of the caudaepididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **J Androl**, v. 27, p.534-541, 2006.

MUINO-BLANCO, T.; PEREZ-PE, R.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reprod. Domest. Anim.** v.43, suppl.4, p.18-31, 2008.

NOVAK, S., RUIZ-SANCHEZ, A., DIXON, W.T., FOXCROFT, G.R., DYCK, M.K. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. **Journal Androl.** v. 3, p.188–200, 2010.

O'MEARA, C.M.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; DUFFY, P.; FAIR, S.; EVANS, A.C.O. Lonergan, P. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. **Theriogenology**, v. 67, p. 1262–1268, 2007.

PRIBENSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; SOLTI, L.; DENG, J.; LEDERER, J. The effect of high hydrostatic pressure on the motility of fresh or frozen-thawed bull semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.1, p.199, 2004.

PRIBENSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; CSEH, S.; SOLTI, L.
Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.143–150a, 2005.

PRIBEBSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; ULRICH, P.; KEIKO, L.
Improving the post thaw survival of cryopreserved IVF bovine blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.338b, 2005.

PRIBEBSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.;
KUTVOLGYI, G.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; DENG, J.;
LEDERER, J. Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.181–182, 2007.

PRIBEBSZKY, C.S. e VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes and embryos performance. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p 48-55, 2011.

SALAMON, S. E MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.** 38, p.1–36. 1995.

SALAMON, S. E MAXWELL, W.M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111.2000.

SANTOS, R.M.; BARRETA, M.H.; FRAJBLAT, M.; CUCCO, D.C.; MEZZALIRA, J.C.; BUNN, S.; VIEIRA, A.D.; MEZZALIRA, A. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, v.132, p.839-848, 2006.

SAUNDERS, K.M.; PARKS, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 178–187, 1999.

THERIEN, I.; BERGERON, A.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Mol. Reprod. Dev.** v.71, p.97-106, 2005.

VADNAIS, M.L. E ROBERTS, K.P. Effect of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. **J. Androl.** v.28, p.416-422, 2007.

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