

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA

RENATA CASALI

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

LAGES

2014

RENATA CASALI

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

**Dissertação de Mestrado em Ciência Animal
do Centro de Ciências Agroveterinárias, da
Universidade do Estado de Santa Catarina.**

Orientador: Alceu Mezzalira

LAGES

2014

RENATA CASALI

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Área de concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Alceu Mezzalana – Orientador

Leandro Rodello - UNESP

Rogério Ferreira – CEO/UDESC

Fabrizio Desconsi 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, Denisete. 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. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Reprodução Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

O estresse oxidativo e a capacitação espermática precoce, 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 2 métodos de IA cervical. No experimento 1 o sêmen ovino foi submetido aos tratamentos: controle (TC), ou 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, foi adicionado 600µg de proteína por mL de diluente usado no congelamento, compondo os grupos experimentais: controle (TC), PS ovino (PSLO), PS bovino (PSLB) e PS eqüino (PSLE). O experimento 3 avaliou 2 métodos de IA, a cervical superficial (G1) e a cervical profunda (G2), com pinçamento do fundo de saco vaginal. Os dados *in vitro* foram submetidos a análise de variância e teste DMS de Fischer, 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%), assim como maior integridade de membrana (IM) (TC - 36,6%) versus (P200 - 30,2%) e (P800 - 30,4%), não diferindo da P500 (34,3%). Na MP durante o Teste de termo resistência (TTR), MP após percoll (PP), integridade de acrossoma (IA), IAPP e integridade de membrana (IM), não houve diferença entre os grupos. Na clivagem não houve diferença entre os grupos TC 44,3%; P200 51,2% e P500 50,9%, que foram superiores ao P800 (34,5%). Conclui-se que a P500 é a mais adequada para uso com sêmen ovino, possibilitando elevada taxa de desenvolvimento embrionário após FIV heteróloga com oócitos bovinos. 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-PNA), estabilidade de membrana (M540); integridade de cromatina (acridinaorange); apoptose (anexina) e potencial de mitocôndria (mitotracker). O PSLE apresentou maior taxa de clivagem (71,37%) que os demais tratamentos, evidenciando sua

maior capacidade de penetração nos oócitos. Observou-se superioridade do PSLE nos parâmetros VCL (PC-163,5, PSLE-186,2) e ALH (PC-9, PSLE-8,2) do CASA, em relação ao controle. Na citometria de fluxo, o teste da anexina revelou maior quantidade de células viáveis não apoptóticas no PSLE (38,9%) em relação ao TC (32,1%). No experimento 3 não houve diferença na prenhez após IA superficial (33,3%) 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 enable the use of frozen semen in the cervical artificial insemination of sheep.** 2014. 55p. Master Dissertation in Animal Science - Area: Animal Reproduction – 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 was added per mL of 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 (G2) with clamping the vaginal fornix. The in vitro data were subjected to analysis of variance and DMS Fischer test, and the pregnancy rate to the chi square, 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. Also higher membrane integrity (IM) was observed in (TC - 36.6%) versus (P200 - 30.2%) and (P800 - 30.4%), but without difference from P500 (34.3%). In PM during the test the thermal resistance (TTR), MP after percoll (PP), acrosome integrity (IA), IAPP and membrane integrity (MI), there was no difference between the groups. In cleavage rate, no differences were observed between groups (TC 44.3%, P200 51.2% and P500 50.9%), which were higher than P800 (34.5%). In conclusion the P500 is the most appropriate for use in ram semen cryopreservation, enabling high rates of embryo development after heterologous IVF. 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; acrossoma integrity (FITC-PSA), membrane stability (M540), chromatin integrity (acridine orange), apoptosis (annexin) and potential of mitochondria

(Mitotracker). The PSLE showed higher cleavage rate (71.37%) than all other treatment indicating greater ability to oocyte penetration. The PSLE showed higher VCL (PC-163.5, PSLE-186.2) and ALH (PC-9 PSLE-8.2) 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 (G2 52.2%) IA, possibly due to the small number of animals used.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1.Danos decorrentes da criopreservação.....	12
2.2. Pressão hidrostática aplicada sobre células.....	13
2.3. Plasma seminal.....	13
3.CAPÍTULO 1 - Pressão negativa no pré congelamento de sêmen ovino	16
3.1. Introdução.....	19
3.2. Materiais e métodos.....	19
3.3. Análise estatística.....	22
3.4. Resultados.....	22
3.5. Discussão.....	23
3.6. Referências bibliográficas.....	25
4. CAPITULO 2 - Plasma seminal heterólogo liofilizado aumenta a viabilidade de sêmen ovino congelado	27
4.1. Introdução.....	29
4.2. Materiais e métodos.....	30
4.3. Análise estatística.....	33
4.4. Resultados.....	34
4.5. Discussão.....	37
4.6. Referências bibliográficas.....	39
5. CAPITULO 3.....	43
5.1. Introdução.....	43
5.2. Materiais e métodos.....	44
5.3. Resultados.....	46
5.4. Referências bibliográficas.....	46
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	50

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Experimento 1

Tabela I: Percentuais de motilidade progressiva (MP) no pós-descongelamento e após 1h, 2h e 3h de teste de Termo Resistência (TTR) e após submissão ao gradiente de Percoll (PP) de sêmen ovino congelado, após submissão a pressão negativa de 0 (Controle), 200, 500 ou 800mBar de pressão negativa22

Tabela II: Avaliação percentual da integridade de acrossoma (IA) e integridade de membrana (IM) após descongelamento e após submissão ao 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..... 23

Experimento 2

Tabela 1. Percentuais médios 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).....34

Fig 1. Bandas proteicas presentes no plasma seminal ovino (PSO), bovino (PSB) e equino (PSE) indicadas por peso molecular em kDa.....34

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 3m sêmen ovino congelado em Tris (Cont) e Tris adicionado de plasma seminal equino liofilizado (PSLE)... 35

Tabela 3. Valores percentuais 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).....35

Tabela 4. Valores de apoptose espermática por anexina, indicando em porcentagem células necróticas, células viáveis e células apoptóticas de sêmen ovino congelado em Tris (Cont) ou Tris adicionado de Plasma seminal equino liofilizado (PSLE)36

Experimento 3

Figura 1 – Foto ilustrativa dos pistoletes utilizados na IA superficial (esquerda) ou profunda (direita) de ovelhas.....45

Figura 2 - Foto ilustrativa do pinçamento de tecidos e exteriorização da cérvix, na IA profunda em ovelhas 45

Tabela 1. Taxas de prenhez após inseminação com sêmen resfriado, por via cervical superficial, ou cervical profunda e intrauterina em ovelhas 46

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 condicionados a 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 as 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). Já devido a anatomia da cérvix ovina, a taxa de penetração cervical na inseminação é influenciada (SALAMON & MAXWELL, 2000) e constitui uma relevante barreira à penetração espermática, em função do comprimento e a excentricidade dos anéis cervicais (ÁLVAREZ et al., 2000).

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 conseqüentemente 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 e 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) demonstrou os efeitos adjuvantes do plasma seminal (PS) quando adicionado ao sêmen de carneiro, que avaliaram o comportamento da célula espermática submetida a um estresse térmico (5 min / 10°C) na presença do plasma seminal. 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) demonstrando efeito benéfico nos danos causados pela criopreservação, pois 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 (2009).

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 um aumento significativo 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 experimentos, sendo que o primeiro avaliará o efeito e diferentes intensidades de pressão negativa no pré-congelamento do sêmen; o segundo avaliará o efeito da adição do plasma seminal heterólogo liofilizado ao diluente de congelamento e o terceiro a aplicabilidade do método de IA via cervical com pinçamento de fundo de saco vaginal em ovinos. 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 espermatozóide 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 e MAXWELL, 1999), resultando em menores taxas de prenhez quando usado o sêmen congelado em comparação com sêmen fresco.

Situações de estresse como mudança na temperatura, estresse osmótico e tóxico do crioprotetor e o 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 espermatozóides congelados estão associados a alta incidência de mortalidade embrionária precoce (SALAMON e MAXWELL, 1995). Elementos do citoesqueleto embrionário são sensíveis a alteração na temperatura e o resfriamento resulta na despolarização dos filamentos de actina (SAUNDERS e PARKS, 1999).

Conseqüentemente, alternativas que preservem a viabilidade seminal no pós-descongelamento, permitindo que um maior número de espermatozóides 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, precisa-se otimizar não só a quantidade de espermatozóides vivos, mas a funcionalidade dos mesmos.

2.2. PRESSÃO HIDROSTÁTICA APLICADA SOBRE CÉLULAS

Pribebszky et al. (2004) utilizou 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, desencadeou uma maior criotolerância de gametas e embriões (PRIBEBSZKY e 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).

Com certa analogia foi desenvolvido um equipamento (Nitrocooler) que tem a finalidade de aplicar 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). 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, re-aquecimento

esexagem por citometria de fluxo, remove o plasma seminal e pode modificar as proteínas ligadas à superfície do espermatozoide. Isso desestabiliza as membranas e pode pré-capacitar os espermatozoides, encurtando sua vida útil na fertilização. 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 um componente específico que estabiliza a membrana de 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 e a fertilidade depois da IA cervical foi significativamente maior.

Mortimer e Maxwell (2004), relatam que espermatozoides descongelados re-suspendidos em PS artificial ou PS de carneiro melhoraram o movimento e aumentaram 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 Leahyet al. (2010) onde a melhora foi observada apenas *in vitro*.

Barrios et al. (2005) isolou a proteína p14 e p20kd, 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, reforçando 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) demonstrou 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 idéia 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 (MUINO-BLANCO et al., 2008; VADNAIS e ROBERTS, 2007).

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 durante desenvolvimento embrionário inicial, 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 subférteis, 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 e MILLER, 2001).

Em javalis, estudos recentes têm mostrado 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 e 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 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, a saber: Controle; Pressão negativa de 200mBar (P200); Pressão negativa de 500mBar (P500) e Pressão negativa de 800mBar (P800). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL e congelado no equipamento TK3000 Compact (5 replicações). Foram avaliadas a motilidade progressiva (MP) no pós-descongelamento e durante o TTR (1,2 e 3h). Também foi avaliada a integridade de acrossoma (IA) pela coloração FITC, a integridade de membrana (IM) pelo teste hiposmótico, a MP após seleção por percoll (MPPP), a integridade de acrossoma pós percoll (IAPP), a integridade de membrana pós percoll (IMPP) e a taxa de clivagem após a FIV heteróloga com oócitos bovinos. Os dados foram avaliados como blocos casualizados, pelo teste DMS de Fischer com significância de 5%. Logo 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), assim como em relação a IA (55,4%; 52,4%; 49,5% e 49,8%, respectivamente), a MPPP (66%; 59,2%; 51,7% e 63,2%, respectivamente), a IAPP (46,4%; 45,7%; 46,2% e 49,3%, respectivamente) e IMPP (45,4%; 39,9%; 47,3% e 41,1%, respectivamente). Quanto a IM, o grupo Controle (36,6%) foi superior a P200 (30,2%) e a P800 (30,4%), não diferindo da P500 (34,3%). Na clivagem, observou-se que a P800 (34,5%) foi inferior aos demais grupos (Controle 44,3%; P200 51,2% e P500 50,9%), que não diferiram entre si. 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.

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 in 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 (IA) by FITC staining, membrane integrity (MI) by hypoosmotic test, MP after percoll selection (MPPP), acrosome integrity post percoll (IAPP), membrane integrity post percoll (IMPP), and cleavage rate after heterologous IVF with bovine oocytes. Data were analyzed as a randomized blocks by DMS Fischer's test with a significance level of 5%. 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 IA (55.4%, 52.4%, 49.5% and 49.8%, respectively), the MPPP (66%, 59.2%, 51.7% and 63.2%, respectively), the IAPP (46.4%, 45.7%, 46.2% and 49.3%, respectively) and IMPP (45.4%, 39.9%, 47.3% and 41.1%, respectively). In the IM, the control group (36.6%) was higher than P200 (30.2%) and P800 (30.4%) but did not differ from P500 (34.3%). In the cleavage rate, it was observed that P800 (34.5%) was lower than the other groups (control 44.3%, 51.2% P200 and P500 50.9%), without difference among them. With basis on obtained data, it was concluded that the negative pressure of 500mbar 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 –Cryopreservation, 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 essas 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 e 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).

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 e VAJTA, 2011).

Trabalhos realizados com o emprego de pressão negativa resultaram no aumento da criotolerância de blastocistos bovinos PIV (MEZZALIRA et al., 2010). O equipamento desenvolvido para a geração de pressão negativa controlada (Nitrocooler) tem baixo custo e é de fácil aplicabilidade. Desta forma, o emprego de pressão negativa no pré-congelamento de sêmen ovino pode melhorar sua criotolerância e possibilitar seu emprego na inseminação cervical.

Todavia, é necessário buscar a intensidade de pressão mais adequada para emprego com sêmen ovino, bem como mensurar seu potencial efeito no aumento da criotolerância. Este estudo tem como objetivo estabelecer a melhor pressão a ser aplicada no pré-congelamento de sêmen ovino, bem como avaliar seu efeito na criotolerância das células espermáticas de ovinos.

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

A coleta dosêmen foi realizada com vagina artificial, sendo imediatamente diluído na proporção 1+3 com tris-gema glicerolado. 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, 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; 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 *Arachishypogaea* (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 punccionados com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após 15 minutos de espera, o sedimento contido nos tubos foi vertido numa placa de Petry, 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 400 µL do meio de maturação *in vitro*, (TCM-199 suplementado com FSH e LH e soro fetal bovino) em placas de cultivo, 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 400 µL 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 1×10^6 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 400 µL de álcool absoluto contendo 10 µL de Bisbenzimid Thihydrochloride, permanecendo neste meio por um período de 8 minutos. Logo após, foi adicionada uma gota de aproximadamente 10 µL 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

Para as variáveis taxa de penetração espermática após FIV heteróloga, motilidade progressiva, integridade de acrossoma, integridade de membrana no pós-descongelamento, no TTR (1, 2 e 3h) e após a seleção pelo gradiente de Percoll foram avaliados como blocos casualizados, sem efeito da repetição, pelo teste DMS de Fischer com significância de 5%.

3.4. RESULTADOS

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

Tabela I: Percentuais de motilidade progressiva (MP) no pós-descongelamento e após 1h, 2h e 3h de Teste de Termo Resistência (TTR) e após submissão ao gradiente de Percoll (PP) de sêmen ovino congelado, após submissão a pressão negativa de 0 (Controle), 200, 500 ou 800mBar de pressão negativa.

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

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

Não foram observadas diferenças em relação à integridade de acrossoma (IA) pós-descongelamento e integridade de acrossoma após gradiente de Percoll. A avaliação pelo teste hiposmótico revelou que a integridade de membrana (IM) pós-descongelamento do grupo controle foi superior aos grupos P200 e P800, porém não diferiu do grupo P500. Em relação à integridade de membrana pós-Percoll (IMPP) os resultados obtidos entre os grupos avaliados não

diferiram entre si. Em relação às taxas de clivagem, observou-se que a P800 (34,5%) foi inferior aos demais grupos (Controle- 44,3%, P200-51,2% e P500-50,9%), os quais não diferiram entre si (Tabela II).

Tabela II: Avaliação percentual da integridade de acrossoma (IA) e integridade de membrana (IM) após descongelamento e após submissão ao 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	IA	IA (PÓS PERCOLL)	IM	IM (PÓS PERCOLL)	TAXA DE CLIVAGEM
CONTROLE	55,4 ^a	46,4 ^a	36,6 ^a	45,4 ^a	44,3 ^a
P200	52,4 ^a	45,7 ^a	30,2 ^b	39,9 ^a	51,2 ^a
P500	49,5 ^a	46,2 ^a	34,3 ^b	47,3 ^a	50,9 ^a
P800	49,8 ^a	49,3 ^a	30,4 ^b	41,1 ^a	34,5 ^b

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

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). Da mesma forma o emprego da pressão negativa se mostrou 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.

Logo após o descongelamento, a motilidade progressiva foi influenciada negativamente pelos três níveis de pressão negativa empregados (200, 500 e 800 mBar) em relação ao 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 e VAJTA, 2011). Assim, era esperado que logo após o descongelamento, não haveria tempo suficiente para o desencadeamento dessas ações.

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. 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 estatísticas 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, não diferindo do controle nas avaliações pós TTR e pós Percoll.

Não foi observado alterações na integridade do acrossomo em função das pressões aplicadas, demonstrando que neste quesito até mesmo a pressão de 800 mBar não produz efeitos negativos (Tabela II). Já na avaliação da integridade de membrana, verificou-se um efeito negativo das pressões negativas de 200 e 800 mBar, enquanto a pressão de 500 mBar não diferiu do controle, sugerindo ser a mais adequada para emprego no pré-congelamento de sêmen ovino. Cabe ressaltar que mesmo as pressões de 200 e 800 mBar, que induziram uma redução na integridade de membrana no pós descongelamento, não tiveram efeito prejudicial na avaliação da integridade de membrana realizada após Percoll. É possível que parte dos espermatozoides com lesões de membrana tenham sido retidos pelo processo de seleção com gradiente de Percoll.

Na avaliação da taxa de penetração espermática *in vitro*(clivagem), obtida pela formação de pró-núcleos, observou-se as pressões de 200 ou 500mBar produziram as mesmas taxas de desenvolvimento do grupo controle, embora numericamente superiores. Já 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.

Embora as avaliações realizadas neste estudo não tenham possibilitado demonstrar estatisticamente um efeito benéfico da pressão negativa na criotolerância do sêmen ovino, é possível que isso possa ser obtido nas avaliações *in vivo*, medidas pelas taxas de prenhez após inseminação com sêmen congelado. 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, metodologia usada para acessar a fertilidade *in vivo* do sêmen congelado ovino (GARCIA-ÁLVAREZ et al., 2009). 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 espermatozóides ovinos.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.; SOLTI, 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.

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. 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. CAPÍTULO 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) tem se mostrado 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 eqüino (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 ou 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 foi avaliado através de parâmetros do CASA, integridade de acrossoma (FITC-PSA), estabilidade de membrana (M540), integridade de cromatina (acridinaorange), apoptose (anexina) e potencial de mitocôndria (mitotracker). Os dados foram avaliados por análise de variância, teste DMS de Fischer a significância 5%. Não houve diferença entre grupos quanto a MP-PD e MP-PP. No entanto, o grupo PSLE mostrou-se superior (71,37%) em relação a clivagem quando comparado aos demais tratamentos (TC: 43,23%, PSLO: 50% e PSLB: 53,98%). Observou-se diferença nos parâmetros do CASA VCL (TC-163,5, PSLE-186,2) e ALH (TC-9, PSLE-8,2). 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 via cervical

ABSTRACT

HETEROLOGOUS LYOPHILISATED SEMINAL PLASMA INCREASE SPERM
VIABILITY IN FROZEN OVINE SEMEN

The use of seminal plasma (PS) has shown promise in protecting and reversing cell damage caused by cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the addition of ovine lyophilized PS (PSLO), bovine (PSLB) and equine (PSLE) 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 was 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 DMS Fischer test with 5% of significance level. There was no difference between groups regarding the MP-DP and 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 was observed in the parameters VCL (TC-163.5, PSLE-186.2) and ALH (TC-9.0 PSLE-8.2) 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 diluent 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, insemination via cervical

4.1. INTRODUÇÃO

O processamento do sêmen (dilução, 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, estratégias para que o sêmen congelado tenha uma viabilidade prolongada, que otimize seu transporte através da tortuosa cérvix ovina e proporcione índices de prenhez aceitáveis na inseminações via cervical, são necessários. A inseminação intrauterina por laparoscopia é 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 e 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 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), assim como entre bovinos e equinos (CALVETE et al., 1997, BRANDON et al., 1999). Martins et al (2009) relataram o efeito positivo da adição de plasma seminal heterólogo ao semen congelado ovino.

No entanto, o uso de plasma seminal *in natura* tem seu uso limitado devido ao aumento do volume final da dose inseminante, com a consequente redução da concentração espermática, o que é limitante na IA cervical em ovinos. Uma alternativa viável seria o emprego da liofilização do plasma seminal heterólogo para que esse possa ser incorporado ao meio de congelamento com

pouca alteração de volume. Como não existem relatos do emprego de plasma seminal liofilizado e apenas um com o uso do plasma heterólogo, é oportuna esta avaliação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição do PS ovino liofilizado (PSLO), bovino (PSLB) e eqüino (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 e a fecundação in vitro (FIV) 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. Os ejaculados foram centrifugados, e o sobrenadante re-centrifugado até que não houvesse mais a formação de pellet (centrifugação a 5000 rpm (centrífuga Fanem Baby[®]). 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, dosagem de proteína em gel de agarose e liofilizado 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 sendo diluídos 1+3 com Tris-gema glicerolado (EVANS e 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 envazadas em palhetas 0,25mL e 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 Bisbenzimidazole Thiohydrochloride 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 partiu-se para avaliações minuciosas do melhor tratamento e do grupo controle. Foram avaliados na Universidade do Estado de São Paulo - UNESP quanto a parâmetros de velocidade espermática com o auxílio de análise computadorizada da cinética espermática (CASA) e de estrutura por citometria de fluxo.

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, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Avaliações por citometria de fluxo

As análises de integridade da membrana plasmática e reação acrossomal, quantificação de apoptose espermática, estabilidade 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 bi-dimensionais em uma escala logarítmica foram analisados pelo *software* CFlow Plus[®].

Integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal

Para a avaliação, uma alíquota de 1µL de sêmen foi retirada e adicionada a 100µL de TRIS em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL pré-aquecidos a 37°C. Em seguida foram adicionados a amostra 2µL de iodeto de propídio (0,5mg/mL em solução salina isotônica) e 25µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA –100µg/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 descongelação (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 (25µM/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 1×10^6 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 é considerado normal, e quando uma fita simples emite fluorescência vermelha, o DNA é considerado desnaturado.

Após a descongelação 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 2×10^6 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 fluorocromo 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 foram avaliados por análise de variância, teste DMS de Fischer a significância 5% por o programa estatístico Jump.

4.4. RESULTADOS

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

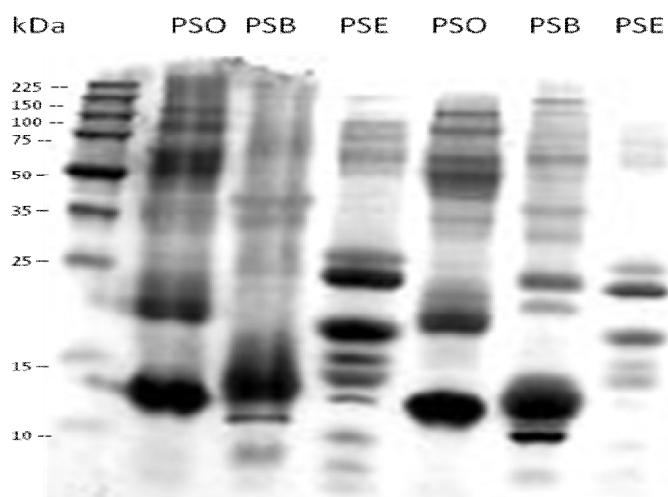


Fig 1. Bandas proteicas presentes no plasma seminal ovino (PSO), bovino (PSB) e equino (PSE) indicadas por peso molecular em kDa.

Quanto às avaliações pós-descongelamento não houve diferença entre as médias das taxas de MP-PD entre nenhum dos grupos (TC: 31,25%; PSLO: 33,75%; PSLB: 37,08% e PSLE: 41,25%) o que também ocorreu com a MP-PP (TC:45,83%; PSLO: 47,08%; PSLB: 47,91% e PSLE: 52,91%). Já na taxa de clivagem, o grupo PSLE mostrou-se superior (71,37%) em relação aos demais tratamentos (TC=43,23%, PSLO= 50% e PSLB=53,98%).

Tabela 1. Percentuais médios de viabilidade espermática avaliados pela motilidade progressiva pós descongelamento (MP-PD) e pós percoll (MP-PP), assim comotaxas 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% ^a	33,75% ^a	37,08% ^a	41,25% ^a
MP-PP	45,83% ^a	47,08% ^a	47,91% ^a	52,91% ^a
Clivagem	43,23% ^c	50% ^{bc}	53,98% ^b	71,37% ^a

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

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 curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) e frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz) e 3m sêmen ovino congelado em Tris (Cont) e Tris adicionado de plasma seminal equino liofilizado (PSLE).

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

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) * $P=0.069$.*

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 demotilidade 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	22,3	75,9	42,6
PSLE	56,5	25,3	75,9	40,4

($P>0,05$)

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 de apoptose espermática por anexina, indicando em porcentagem células necróticas, células viáveis e células apoptóticas de sêmen ovino congelado em Tris (Cont) ou Tris adicionado de Plasma seminal equino liofilizado (PSLE).

	NECRÓTICAS	VIÁVEIS	APOPTÓTICAS
CONT	66,9 ^a	32,1 ^a	0,09 ^a
PSLE	61,1 ^b	38,9 ^b	0,04 ^b

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

Na integridade da membrana plasmática e membrana acrossomal não reagida (FITC-PSA) não foi observada diferença para os grupos controle (22,1) e PSLE (24,1). Na avaliação da estabilidade e fluidez das membranas espermática por YOPRO M540, não foram verificadas diferenças entre os percentuais de estáveis (28,1 vs 28,3) para os grupos controle e PSLE, respectivamente. Da mesma forma, não foi verificada influência de PSLE no potencial de mitocôndria por Mitotracker, sendo observados valores idênticos para alto potencial (72,1) e baixo potencial (27,9) 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 PS se devem a proteínas e fatores antioxidantes capazes de conservar a integridade funcional da membrana celular e reverter injúrias como a peroxidação lipídica (MAXWELL e WATSON, 1996; BALERCIA et al., 2003) e choque térmico (BERGUER et al., 1985; BARRIOS et al., 2000).

Todavia, este estudo relata pela primeira vez o emprego de PS heterólogo liofilizado, como aditivo no congelamento de sêmen ovino. A liofilização permite a incorporação do PS, evitando a indesejável redução da concentração espermática da dose inseminante. Além disso, a quantificação das proteínas de PS liofilizado permite a padronização da adição do PS, 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), assim como entre bovinos e eqüinos (CALVETE et al., 1997; BRANDON et al., 1999). Todavia, a semelhança entre as proteínas do PSO e PSE não é tão evidente. Mesmo assim, o efeito positivo da adição de plasma seminal heterólogo equino ao sêmen congelado ovino já foi descrito (MARTINS et al., 2009). Isto demonstra que a homologia entre as proteínas do PS não é essencial para a proteção aos espermatozoides. O experimento 1 demonstrou uma clara evidência do efeito benéfico da adição de PS liofilizado no pré congelamento do sêmen ovino. Na avaliação da MP pós descongelamento e pós percoll, embora não tenham diferido estatisticamente, todos os índices obtidos com a adição de PS foram numericamente mais elevados. Já na avaliação das taxas de clivagem, observou-se um efeito positivo do PSLE. Curiosamente, o PS eqüino, 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 e 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 por

laparoscopia, com a taxa de clivagem in vitro. A maior taxa de clivagem do PSLE, que apresenta menor igualdade protéica com o PSLO, 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 a proteínas específicas que estejam presentes nos distintos PS. Evidências experimentais sugerem que a Osteopontina (Proteína do plasma de Touros) afeta a ligação espermatozoário durante desenvolvimento embrionário inicial (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 das promotoras do resultado encontrado.

Em função da inquestionável superioridade do efeito benéfico do PSLE, em relação ao PSLO e PSLB, observado no primeiro experimento, nas demais avaliações foi comparado apenas o PSLE com um grupo controle.

O sêmen congelado foi avaliado pelo sistema CASA, comparando-se o grupo controle e o grupo adicionado de PSLE. Superioridade do PSLE foi observada no parâmetro VCL o qual indica a velocidade curvilinear, a velocidade real do espermatozoário 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 espermatozoário alcançar o local da fertilização (YÁÑIZ et al., 2000, 2006). Ainda, foi verificado menor ALH do grupo PSLE em relação ao controle que apresentou uma hiperativação espermática, que não é desejável neste momento.

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.

Inesperadamente nas avaliações de integridade de acrossoma, da estabilidade e fluidez das membranas espermática, 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 melhorou sua viabilidade pós-descongelamento (PD) e proporciona maiores taxas de clivagem após FIV heteróloga com oócitos bovinos, evidenciando uma maior

capacidade de penetração dos espermatozóides tratados. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o PSLE pode ser uma alternativa para viabilizar a inseminação artificial cervical com sêmen ovino congelado.

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-PÉREZ, 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.; RAIDÁ, 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.

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 ram 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. **Theriogenology**63,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**Volume 77, Issue 2, p. 395–399. 2012.

MARTINS, L. T. **Adição de plasma seminal heterólogo como estratégia para aumentar a fertilidade do sêmen ovino congelado** 2009. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2009.

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 and 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

CATETERIZAÇÃO DA CÉRVIX POR PINÇAMENTO E TRAÇÃO DO FUNDO DE SACO VAGINAL.

5.1. INTRODUÇÃO

Na espécie ovina é possível realizar inseminação vaginal, intracervical, transcervical e por laparoscopia. A realização das duas primeiras só apresenta taxas de prenhez aceitáveis se for utilizado sêmen fresco (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 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 4-7 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; endireitar a cérvix 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 descongelado (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 cérvix) 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 cérvix 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 cérvix.

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 cérvix, 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 cérvix do orifício

vaginal (figura 2). Com os dedos indicador e polegar, realizava-se a manipulação da cérvix para a introdução do aplicador seguida da inseminação propriamente dita. Para a técnica de IA superficial, o inseminador inseria um espéculo previamente lubrificado e, após localização da cérvix, com o auxílio do aplicador realizava a deposição do sêmen na entrada da cérvix. Cada fêmea era inseminada 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 para diagnóstico de prenhez via transretal com transdutor linear 7,5Mhz (ISHWAR, 1995) para detecção de prenhez.



Fig.1 – Foto ilustrativa dos pistoletes utilizados na IA superficial (esquerda) ou profunda (direita) de ovelhas.



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

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%

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. Todavia, embora o número de animais seja reduzido, a taxa de prenhez observada nas fêmeas com cateterismo total da cérvix, não foi diferentes (55,5%) da observada nas fêmeas com IA profunda (50%). Foi observado que a técnica de pinçamentodo 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 tratamentos, existe uma considerável variação numérica entre os grupos, indicando uma diferença que é significante 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.

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. CONCLUSÕES GERAIS

As particularidades na espécie ovina que dificultam a disseminação de biotécnicas reprodutivas instigam a busca por técnicas que aumentem a qualidade seminal, consequentemente 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 pela primeira vez 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 espermatozóides 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.

7. 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.; GALLEGU, 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.; FERNÁNDEZ-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.
- BRAUNDMEIER, 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**. Volume 69, Issue 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*, 2004, v.84, p.359–368.

DU, Y.; PRIBENSZKY, C.S.; MOLNAR, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; KUWAYAMA, M.; PEDERSEN, A.M.; VILLEMOES, 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**, 2008, v.135, p.13-17.

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

EL-HAJJ GHAOU, 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.** 2007, v.28, p.109-122.

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. 2000, v.2, p.74.

GILLIAN, L. E MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **J. Reprod. Fétil. 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., PRIBENZSKY, 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**, 2009, v.87, p.143-150.

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.1202–7.1993.

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.** 2009, v.21, p.571-578.

LEAHY, T., MARTI, J.I., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 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. **Adição de plasma seminal heterólogo como estratégia para aumentar a fertilidade do sêmen ovino congelado**.2009. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2009.

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**1997:8: 1165-1 178.

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.** 1999, v.11, p.123-126.

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.

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**, 2004, v.127, p.285-291.

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**, 27,p.534–41.2006.

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

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.** 2010;31:188–200.

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**, 2007, v.67, p.1262–1268.

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**, 2004, v.16, n.1, p.199.

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

PRIBENSZKY, 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**, 2005, v.40, p.338b.

PRIBENSZKY, 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**, 2007, v.19, p.181–182.

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

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**, 2006, v.132, p.839-848.

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

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.** 2005, v.71, p.97-106.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60-61, 481-492.2000.