



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL NA  
DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO AVALIADO *IN*  
*VITRO* E NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL**

**THIAGO ANTONIO DE SOUZA NASCIMENTO SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF**  
**JULHO/2007**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL NA DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO  
AVALIADO *IN VITRO* E NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL**

**Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves  
CO-ORIENTADOR: Dr. Rodolfo Rumpf**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 270/2007**

**BRASÍLIA/DF  
JULHO/2007  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL NA DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO  
AVALIADO *IN VITRO* E NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL**

**Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA  
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE PRODUÇÃO ANIMAL.**

---

**Rodolfo Rumpf, Doutor (EMBRAPA-CENARGEN)  
(CO-ORIENTADOR) CPF: 295718049-91 E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br**

**APROVADA POR:**

---

**Jairo Pereira Neves, Doutor (FAV/UnB)  
(ORIENTADOR) CPF: 065863509-30 E-mail: jpneves@unb.br**

---

**Cristiano Barros de Melo, Doutor (FAV/UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 574596905-97 E-mail: cristianomelo@unb.br**

---

**Jose Robson Bezerra Sereno, PhD., EMBRAPA-CPAC  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 224518114-04  
E-mail: sereno@cpac.embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 04 de Julho de 2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Thiago Antonio de Souza Nascimento

**Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado *in vitro* e na inseminação artificial cervical.**

Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva; orientação do Dr. Jairo Pereira Neves, Brasília, 2007.

64 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. Criopreservação. 2. Ovino. 3. Plasma Seminal. 4. Reação do acrossoma. I. Neves, J. P. II. Dr.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVA, T.A.S.N. (2007) **Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado *in vitro* e na inseminação artificial cervical.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007, 64 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado *in vitro* e na inseminação artificial cervical.

GRAU: Mestre ANO: 2007

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva

CPF: 700429851-53

SMPW, quadra 4, conjunto 6, lote 4, casa G

CEP 71735-400 – Núcleo Bandeirante/DF - Brasil

Telefone: (61) 3386-4007/ (61) 9985-8709 E-mail: [tasnsilva@yahoo.com.br](mailto:tasnsilva@yahoo.com.br)

## DEDICATÓRIA

Dedico esta obra aos meus pais (Zé e Zélia) pelo amor, oportunidade, apoio e conforto em todos os momentos, pelos ensinamentos e lições de vida tenho a mais profunda admiração e respeito por vocês. Obrigado por vocês serem meus pais.

Ao meu amor (Bianca Damiani Marques Silva) pela dedicação e companheirismo estando ao meu lado em todos os momentos na realização deste trabalho, pelo incondicional apoio, carinho e amor, quero te agradecer porque você fez, faz e fará sempre parte de minha vida (Te amo para sempre).

Ao Dr Jairo Pereira Neves, Orientador e amigo, homem sábio e exemplo a ser seguido, minha gratidão é imensa pela dedicação, pelo irrestrito apoio, confiança e orientação em todas as etapas deste trabalho. “Mestre é você, meu professor amigo que me compreende, me estimula, me ajuda me comunica e me enriquece com sua presença, seu saber e sua ternura. Eu serei sempre um seu discípulo na escola da vida”. Obrigado!

(N.Maccari)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus acima de tudo, por estar ao meu lado guiando meus passos, e que me dá saúde, força de vontade e alegria de viver cada vez mais.

A Universidade de Brasília (UNB) pela oportunidade de aprimoramento técnico-científico e experiência acadêmica.

A minha família, pelo incentivo, apoio e compreensão.

A família LRA - Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio, compreensão e ensinamentos.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf pela grande oportunidade fornecida para o aperfeiçoamento profissional, apoio e amizade.

A Dr<sup>a</sup>. Margot Alves Dode Nunes, Dr. Carlos Frederico Martins pela atenção, amizade e ensinamentos que me acompanharão por toda vida.

Aos Drs. Roberto Sartori, Maurício Franco, Ivo Pivato, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da EMBRAPA e estagiários. Foram prestativos e colaboram na realização dos experimentos.

Ao pesquisador e estatístico da EMBRAPA Pecuária Sudeste Sr. Waldomiro Barione Junior, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos grandes amigos que fiz na EMBRAPA, Alexandre Ramos, Katlen Driessen, Leo Goiano, Edson Ramiro, Marcelo Tigre, Monique Guardieiro, Eduardo Catarina, Daniela Pereira pela amizade construída com muito carinho.

Aos meus grandes amigos André Triacca, Samia Triacca, Bruno Sadeck, Guilherme Tognoli, Cibeli Thomas, Fernanda Rezende, pela eterna amizade.

Ao laboratório BIOREP da Universidade Federal de Santa Maria pelo apoio na realização do experimento, a toda sua equipe em especial ao Dr. Paulo Bayard, Juca, Fernanda Peccini.

Aos professores e coordenadores da pós-graduação do curso de Ciências Agrárias da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

## ÍNDICE

<b>Capítulos/Sub-capítulos</b>	<b>Página</b>
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
A atividade do espermatozóide.....	4
Membrana plasmática.....	5
Capacitação espermática.....	6
Reação acrossômica.....	9
Criopreservação de sêmen.....	9
Avaliação do sêmen.....	12
Motilidade e vigor espermático.....	12
Morfologia espermática.....	13
Integridade de membrana.....	13
Integridade de acrossoma.....	14
Plasma seminal.....	14
Inseminação artificial.....	16
OBJETIVOS.....	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>24</b>
<b>VIABILIDADE E ESTADO ACROSSOMAL DO SÊMEN OVINO DESCONGELADO E INCUBADO COM PLASMA SEMINAL</b>	
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>40</b>
<b>USO DO PLASMA SEMINAL NA DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO PARA INSEMINAÇÃO TRANSCERVICAL EM OVELHAS COM ESTRO SINCRONIZADO</b>	
INTRODUÇÃO .....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
Coleta e avaliação de sêmen.....	45

Criopreservação.....	46
Coleta do plasma seminal.....	46
Avaliação do sêmen congelado.....	46
Sincronização estral das ovelhas.....	47
Método de inseminação artificial.....	47
Diagnóstico de prenhez.....	47
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	54



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo 1</b>	
1.1. Médias ( $\pm$ desvio padrão) da motilidade espermática, entre tratamentos com PBS e PS, em quatro momentos de incubação à 37 °C.....	38
1.2. Médias Médias ( $\pm$ desvio padrão) da integridade de acrossoma, entre tratamentos com PBS e PS, em quatro momentos de incubação à 37°C. Avaliados pelos parâmetros de espermatozoides vivos íntegros (VI), vivo reagido (VR), morto íntegro (MI) e morto reagido (MR).....	39
<b>Capítulo 2</b>	
2.1. Informações espermáticas das partidas selecionadas para a IA. Dados da motilidade (%), espermatozoides vivos íntegros (VI) (%), espermatozoides vivos reagidos (VR) (%), espermatozoides mortos íntegros (MI) (%) e espermatozoides mortos reagidos (MR) (%) no sêmen ovino na descongelação aprovados pelo ranking a 0h, 2h, 4h e 6h de incubação com tratamento com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e plasma seminal (PS).....	60
2.2. Médias ( $\pm$ desvio-padrão) da motilidade (%) no sêmen ovino na descongelação a 0h, 2h, 4h e 6h de incubação com tratamento com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e plasma seminal (PS).....	61
2.3. Médias ( $\pm$ desvio-padrão) espermatozoides vivos íntegros (VI) (%), espermatozoides vivos reagidos (VR) (%), espermatozoides mortos íntegros (MI) (%) e espermatozoides mortos reagidos (MR) (%) no sêmen ovino na descongelação a 0h e 6h de incubação com tratamento com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e plasma seminal (PS).....	62
2.4. Média do grau de penetração pela cérvix em relação ao total de ovelhas inseminadas e taxa de prenhez correspondente ao grau de penetração da cérvix em ovelhas.....	63
2.5. Média da taxa de gestação em ovelhas inseminadas com sêmen fresco, descongelado adicionado de plasma seminal (PS) e descongelado adicionado de solução salina fosfatada tamponada (PBS) na IA cervical e com três graus de penetração cervical.....	64

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

: - para (exemplo 1:1 – uma parte para uma parte)

® - marca registrada

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BIOREP - laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal

Ca<sup>++</sup> - íon cálcio

CASA- Análise computadorizada do sêmen

cm- centímetro

CTC - clortetraciclina

ECG – gonadotrofina coriônica eqüina

FDA - diacetato de carboxifluoresceína

G - gravidade

GAGS - glicosaminoglicanas

h – horas

HBP - heparin binding proteins (proteínas ligadoras de heparina)

IA – inseminação artificial

IM – intra-muscular

IP – iodeto de propídeo

MAP – acetato de medroxiprogesterona

MI - espermatozóides mortos com acrossoma intacto

µl – microlitro

MHz – megahertz

mg – miligrama

ml – mililitro

MR - espermatozóides mortos com acrossoma reagido

PS – plasma seminal

PBS - solução salina fosfatada tamponada

pH –concentração de íons de hidrogênio

ROS – reactive oxygen species (espécies oxigênio reativas)

SAS – statistical analyse system

sptz/ml – espermatozóides por mililitro

TTR- teste de termoresistência

UI – unidades internacionais

VI - espermatozoides vivos com acrossoma intacto

VR - espermatozoides vivos com acrossoma reagido

# EFEITO DO PLASMA SEMINAL NA DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO AVALIADO *IN VITRO* E NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* e pela inseminação artificial (IA) em ovelhas com estro sincronizado o efeito da adição do plasma seminal (PS) na descongelação do sêmen ovino criopreservado em “pellets”. Foram realizados dois trabalhos. No primeiro foi avaliado *in vitro* a adição do PS. Não houve diferença significativa para o parâmetro de motilidade entre os tratamentos. Mas com relação à integridade do acrossoma a adição do PS proporcionou uma média superior de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro ( $P < 0,05$ ) em relação ao tratamento com PBS nas 2 e 6 horas de incubação. No segundo trabalho foi realizada a avaliação *in vitro* e *in vivo* com IA em ovelhas com estro sincronizado. Os resultados *in vitro* confirmaram os resultados encontrados no primeiro trabalho. As IA foram realizadas em tempo fixo a partir das 50 horas após a retirada dos pessários vaginais, pelo método transcervical sem tração. Conforme o grau de penetração do aplicador de sêmen no canal cervical das ovelhas considerou-se três graus de profundidade caracterizados como: grau 1: superficial; grau 2: intermediário; grau 3: profundo. Como grupo controle 61 ovelhas foram inseminadas com sêmen fresco/diluído com solução salina fosfatada (PBS). Das 100 restantes, metade foi inseminada com sêmen congelado/descongelado com PBS e a outra metade com sêmen congelado/descongelado com PS. Após 45 dias da IA, foi realizado o diagnóstico de prenhez, por ultra-sonografia. As ovelhas inseminadas apresentaram os percentuais de prenhez de 60,0% (50/30), 74,0% (50/38) e 67,2% (61/41), respectivamente, para sêmen congelado/descongelado, com PBS, com PS e fresco/diluído. Os índices de prenhez não diferiram entre os tratamentos (PBS/PS/FRESCO) nos graus 1 e 2 de penetração. No entanto, as percentagens de prenhez diagnosticadas nas ovelhas inseminadas com sêmen fresco (95,6%) e com sêmen congelado com PS (94,1%) foram superiores as obtidas com sêmen congelado com PBS (60,0%;  $P < 0,05$ ) no grau 3 de penetração. Tendo como base os resultados obtidos, conclui-se que, o sêmen congelado utilizado via cervical, adicionado de PS obteve índices de gestação satisfatórios no mesmo nível que o sêmen fresco, é capaz de proporcionar os mesmos índices obtidos com o sêmen

fresco e realizar um efeito protetor nos espermatozoides contra a reação precoce do acrossoma.

**Palavras chaves:** sêmen congelado-descongelado, plasma seminal, reação do acrossoma, inseminação artificial, ovino, carneiro.

## **EFFECT OF SEMINAL PLASMA ON FROZEN-THAWED RAM SEMEN EVALUATED *IN VITRO* AND ON CERVICAL ARTIFICIAL INSEMINATION.**

### **ABSTRACT**

The aim of the present experiment was to evaluate *in vitro* and artificial insemination (AI) in sheep with synchronized estrus the effect of addition of seminal plasma in ram semen frozen-thawed criopreserved at pellets. Two works were made. On the first was evaluate the addition of seminal plasma *in vitro*. To motility there wasn't difference among treatments. But about the acrossome intact the addition of seminal plasma had a higher average of spermatozoa alives with acrossome intact ( $P<0,05$ ) than PBS treatment at 2 and 6 hours of incubation period. On the second experiment was evaluate *in vitro* and *in vivo* with artificial insemination in sheep with synchronized estrus. The results *in vitro* confirmed the results found in the first experiment. The AI was in fixed time, at 50 hours after removing the vaginal device, by the method trans-cervical without traction. The penetration degree of the semen applicator in the ewe cervical channel was classified as following: degree 1: superficial; degree 2: intermediate; degree 3: deep. In control group 61 ewes were inseminated with fresh semen diluted with PBS and the other 100, half ewes were inseminated with frozen-thawed semen with PBS, and the other half ewes was inseminated with frozen-thawed semen with seminal plasma. The diagnosis of pregnancy was performed 45 days after AI with ultrasound. The pregnancy rate was 60.0% (50/30), 74.0% (50/37) and 67.2% (61/41), respectively for frozen semen and thawed without seminal plasma, with seminal plasma and fresh semen. The pregnancy rate did not differ among treatments in degrees 1 and 2. However, the pregnancy in ewes inseminated with fresh semen (95.6%) and with frozen-thawed semen with seminal plasma (94.1%) were higher than with frozen-thawed semen without plasma (60.0%;  $P<0.05$ ) in degree 3. Based on results, the conclusion is,

frozen semen addition of seminal plasma used at cervical way had satisfactory pregnancy rates similar that fresh semen and had a protector effect on spermatozoa against the premature acrosome reaction.

**Key words:** frozen-thawed semen, plasma seminal, acrosome reaction, artificial insemination.

## INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem despertando, principalmente nos últimos anos, um maior interesse de produtores e dos órgãos governamentais, sendo uma alternativa desejável para o incremento da atividade pecuária no país e para uma melhor distribuição de renda. Com o crescimento da produção de carne ovina, tem crescido o interesse em se intensificar a exploração econômica desta espécie. O cenário de hoje voltado para ovinocultura, mostra que está em franca expansão em praticamente todo o país, expandindo-se para regiões onde não havia tradição na sua exploração econômica. Tais fatos apontam para um cenário em que a tendência da atividade é aumentar a sua importância e sua efetiva participação no produto interno bruto (PIB) do agronegócio brasileiro.

Programas de melhoramento genético animal e testes de progênie em raças ovinas adaptadas as condições ambientais de cada região, têm sido desenvolvidos para o aumento do índice produtivo desses animais. A IA com sêmen congelado via cervical poderia viabilizar um melhor aproveitamento de reprodutores geneticamente superiores, porém, os resultados obtidos pela aplicação cervical com sêmen congelado não proporcionam atualmente taxas de prenhez satisfatórias, seja pela falha no transporte ou alterações bioquímicas e moleculares das células submetidas ao processo de congelação e descongelação, seja pela falta de competência dos espermatozoides quanto a sua sobrevivência (Evans & Maxwell, 1990), elevando consideravelmente o custo por cordeiro nascido.

A utilização do sêmen congelado através da aplicação cervical, que permitiria um uso mais expressivo em ovinos, não propicia resultados consistentes (Neves, 1990; Aisen et al., 1999), devido principalmente às alterações bioquímicas e moleculares das células espermáticas submetidas aos processos de congelação e descongelação (Salamon & Maxwell, 1995). Tais alterações da criopreservação, como o aumento da permeabilidade da membrana celular, foram observadas em estudos da ultra-estrutura do acrossoma (Healey, 1969). Entretanto, Eppleston & Maxwell (1993) utilizando sêmen congelado depositado intracervicalmente, em profundidades de penetração acima de 4 cm, obtiveram índices favoráveis (60%) de prenhez, porém, esse grau de penetração foi possível apenas em metade das ovelhas trabalhadas. Na atualidade os diluidores oferecem boa proteção à integridade espermática, no entanto, com os últimos avanços na fisiologia da

fecundação, é possível inferir que a baixa fertilidade do sêmen congelado quando da deposição cervical reside, fundamentalmente, no estado da membrana espermática, pelo aumento do número de células capacitadas e acrossoma reagidos, resultantes do processo de diluição (Maxwell & Johnson, 1999), congelação e descongelação (Salamon & Maxwell, 2000).

O método da laparoscopia, em ovinos vem permitindo a utilização de sêmen congelado incrementando o processo de melhoramento genético, propiciando índices de prenhez semelhantes aos obtidos com a monta natural, no entanto uma série de instrumentais de elevado custo e pessoal especializado é necessária (Souza, 1993). Já a IA com sêmen congelado via cervical teria maior aplicação por produtores por ser uma técnica simples, tornando os programas de IA viáveis destinados a um maior número de rebanhos (Halbert et al., 1990; Souza, 1993), como em bovinos.

Considera-se que o congelação e descongelação do sêmen induzem modificações na estrutura lipídica e protéica da membrana plasmática, promovendo a capacitação e reação precoce de acrossoma (Salamon & Maxwell, 1995; Holt, 2000). Em busca de alternativas para aumentar a viabilidade espermática do sêmen congelado de ovinos, pela IA via cervical superficial, estudos vêm sendo desenvolvidos com a utilização de plasma seminal. Recentes trabalhos mostraram que a utilização de plasma seminal melhora a viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do sêmen de carneiro criopreservado (Ollero et al., 1997), a adição de plasma seminal como solução de descongelação exerce efeito protetor sobre os espermatozoides não capacitados e previne a reação do acrossoma precoce no período pós-descongelação do sêmen ovino (Lausmann, 2002; Silva et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que a composição bioquímica do sêmen, constituído de plasma seminal e componentes espermáticos, variam conforme diversos fatores tais como estação do ano e indivíduo, interferindo, conseqüentemente, no nível de qualidade das amostras criopreservadas com reflexos diretos na repetibilidade de resposta das fêmeas inseminadas em diversas espécies. Por conseguinte, para que os resultados da I.A. sejam consistentes e confiáveis é desejável o conhecimento dos fatores que interferem nas características do plasma seminal.



Um dos estudos identificou os componentes do plasma seminal responsáveis pela reversão do estado de capacitação dos espermatozoides ao estresse por resfriamento assim como as frações de proteínas no plasma seminal ovino que podem aderir na superfície dos espermatozoides capacitados e reverter este estado (Barrios et al., 2000). Há ainda controvérsias sobre qual a real função que as lipoproteínas do plasma seminal exercem sobre os espermatozoides (Quinn et al., 1980; Holt & North, 1998, Barrios et al., 2000).

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

### **A atividade do espermatozóide**

Os espermatozoides são formados no testículo (Franca et al., 2005) e se tornam maduros no epidídimo (Dacheux et al., 2005). Após a ejaculação seguida da cópula, os espermatozoides são depositados na vagina conseqüentemente passando pelas barreiras da cérvix e atingindo o útero cujo transporte dos espermatozoides inicialmente é passivo, sendo realizado por movimentos da musculatura uterina. Em seguida, os espermatozoides movimentam-se ativamente para atravessarem a junção útero-tubárica, que funciona como uma barreira em razão do seu estreito diâmetro e dobras epiteliais. Após esta barreira, os espermatozoides alcançam a porção próxima da tuba uterina (istmo), onde se ligam a mucosa permanecendo temporariamente inativos, sendo este local considerado um reservatório espermático (Yanagimachi, 1994). Próximo à ovulação, os espermatozoides localizados na região do istmo da tuba uterina sofrem modificações bioquímicas que os tornam capazes de penetrar o oócito, isto é, passam pelo processo de capacitação, reação do acrossoma e uma hiperatividade, e vão em direção ao oócito para ligarem-se e resultar na fertilização (Yanagimachi, 1994).

De acordo com Silva & Gadella (2006), após fecundação, o DNA do espermatozóide se descondensa, o pró-núcleo masculino se forma e se liga ao pró-núcleo feminino e dá origem ao genoma diplóide, um novo indivíduo. Portanto, para a obtenção de sucesso na concepção, os espermatozoides devem possuir membrana e organelas íntegras e funcionais e um genoma haplóide intacto. Em técnicas como a IA, os espermatozoides não são diretamente introduzidos no trato genital feminino durante a ejaculação, mas são coletados em recipientes através da vagina artificial ou eletroejaculação. São então avaliados, diluídos, resfriados, congelados por um determinado tempo, descongelados e introduzidos no trato genital feminino, na vagina, cérvix ou diretamente no útero pela IA. O processo de refrigeração, congelação e descongelação do sêmen de carneiro causam lesões na membrana plasmática e acrossomática e redução da motilidade (Valcárcel et al., 1997) como também antecipam a maturação da membrana plasmática, aumentando assim a proporção de espermatozoides capacitados e acrossoma reagido precocemente (Maxwell & Watson, 1996).

Preservar a integridade e funcionalidade do espermatozóide é crucial para a manutenção de sua capacidade fertilizante em especial após procedimentos de estresse como refrigeração, congelação e descongelação, para que se possam obter bons índices de concepção.

### **Membrana plasmática**

Para que os espermatozoides sejam considerados qualitativamente viáveis e potencialmente férteis é necessário que possuam morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas perfeitamente íntegras. Essa condição constitui-se em um pré-requisito para que aconteçam os eventos relacionados ao processo de fertilização (Rodriguez-Martinez et al., 1997). A membrana plasmática dos espermatozoides envolve toda a célula, mantendo todos seus componentes intracelulares e organelas juntos e, através de suas características semipermeáveis, mantém um gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis. Para Ladha (1998), a membrana plasmática consiste de cinco domínios específicos: acrossoma, segmento equatorial, segmento basal, região intermediária e cauda. Diferenças entre estas regiões estão relacionadas as suas diferentes funções fisiológicas. Os espermatozoides podem ser divididos em duas partes morfológica e funcionalmente distintas, a cabeça e a cauda (Hafez & Hafez, 2000). A membrana plasmática da cabeça é subdividida em três segmentos, os quais cobrem o acrossoma, região equatorial e a região pós-acrossômica (Frits et al., 2000).

A estrutura básica da membrana plasmática de qualquer célula é o “mosaico fluído”, constituído por dupla camada lipídica entremeada por moléculas de proteína (Singer e Nicholson, 1972). A divisão funcional da superfície da cabeça dos espermatozoides em domínios laterais e subdomínios é determinada pelas moléculas de superfície (Eddy & O’Brien, 1994). A membrana é composta por lipídeos, proteínas e carboidratos. As membranas devem sua integridade estrutural às propriedades dos lipídeos constituintes. As proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos e os carboidratos desempenham importante papel nas interações entre células (Amann & Graham, 1993).

Durante a maturação epididimária as modificações na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides têm como objetivo promover a estabilização da membrana dos espermatozóides para seu armazenamento no epidídimo e seu transporte nos tratos reprodutivos do macho e da fêmea e, fornecer aos espermatozóides a capacidade fecundante através do estabelecimento da organização molecular necessária à capacitação e fertilização ao entrarem em contato com os fluidos do sistema reprodutivo da fêmea (Parks & Hammerstedt, 1985)

Os lipídios nas membranas são compostos em sua maioria por, glicolípídeos, fosfolípídios, havendo também colesterol na membrana (Parks & Graham, 1992). As proteínas integrais e periféricas exercem quase todas as outras funções da estrutura celular, estabelecendo poros de comunicação entre o meio interno e externo, e recepção de outras moléculas. Dependendo de sua função tem sua proporção variável (Stryer, 1988). Os fosfolípídios podem ser divididos em fosfoglicerolípídeos e esfingomielina. Embora estejam distribuídos em ambas as faces das membranas, cada tipo de fosfolípídios apresenta uma preferência por um de seus lados. A fosfatidilcolina é encontrada em maior proporção no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto a fosfatidiletanolamina e especialmente a fosfatidilserina está localizada no folheto interno, isto devido, provavelmente, ao transporte interno da aminolípídeo translocase. Os lipídeos da membrana são distribuídos assimetricamente (Rathi et al., 2001).

Entre as diferentes espécies, a maior variável é a quantidade de colesterol na membrana plasmática dos espermatozóides. Por exemplo, a membrana plasmática dos espermatozóides humanos apresenta mais de 40% em colesterol dos lipídeos totais, nas outras espécies esse teor é menor. O colesterol pode estar presente tanto na membrana plasmática como no plasma seminal (Cross, 1998). Determinadas condições como o resfriamento, provocam alteração na orientação dos lipídeos, e podem afetar a estabilidade da membrana ou induzem a um rearranjo das moléculas formando pontos de fragilidade, promovendo assim uma permeabilidade excessiva ou mesmo a ruptura da membrana (Amann & Graham, 1993).

### **Capacitação espermática**

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozóides que compõem menos de 1% do volume total e o plasma seminal. As interações entre as

células espermáticas e o fluido seminal iniciam-se desde a espermatogênese (Tulsiani et al., 1997; Naaby-Hansen et al., 1997). As células espermáticas ao alcançarem o epidídimo estão com a membrana plasmática não bem maturada, sofrem extensivas alterações biológicas durante sua passagem pelo epidídimo (Tulsiani et al., 1997) e isso inclui estabilização da cromatina nuclear, motilidade, compactação de fibras da cauda, alterações na composição da membrana com a incorporação de proteínas, açúcares, lipídios e outras modificações bioquímicas (Amann & Graham, 1993). As proteínas secretadas pelo epidídimo e glândulas acessórias que se ligam ao espermatozóide estão envolvidas na ligação deste ao oócito (Gadella et al., 2001).

Os principais fenômenos relacionados a fecundação do gameta feminino são a capacitação espermática e a reação acrossomal. A fertilização é resultado destes eventos moleculares em que os espermatozóides capacitados se ligam ao ovócito e realizam uma série de outros eventos programados antes da penetração na zona pelúcida e fusão com o óvulo (Abou-Haila & Tulsiani, 2000). Os espermatozóides mesmo apresentando motilidade e aparente normalidade morfológica após a ejaculação não têm capacidade de fecundar um ovócito, adquirindo assim esta capacidade no trato genital feminino em um processo denominado capacitação espermática (Yanagimachi, 1994; Pérez et al., 1996).

As mudanças associadas à capacitação dos espermatozóides ocorrem por uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos da membrana plasmática dos espermatozóides. As modificações ocorridas são as desestabilizações celulares onde ocorrem a redistribuição de partículas intramembrana; mudanças bioquímicas da superfície da membrana levando ao aumento da fluidez; morfologia da membrana; remodelagem da superfície dos espermatozóides; aumento do cálcio e do pH interno e hiperpolarização da membrana. Durante esta fase, algumas proteínas de elevada massa molecular e alguns peptídeos, assim como lipídios e colesterol são perdidos da célula, havendo ainda, o aumento da motilidade dos espermatozóides, hiperativação espermática (Austin & Short, 1990; Topfer-Petersen, 2000). A perda de colesterol e ácidos graxos aumenta a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática, iniciando-se o processo de capacitação e reação do acrossoma (Yanagimachi, 1994).

As alterações iniciais na membrana plasmática durante a capacitação, envolvem a remoção periférica de antígenos de superfície e glicoproteínas de origem epididimal e/ou plasma seminal, os fatores de decapacitação, que podem restringir o movimento de proteínas e lipídeos através da membrana (Hafez & Hafez, 2000). A capacitação também pode ser realizada *in vitro* em um meio contendo albumina, heparina e substâncias energéticas como glicose e piruvato. A albumina e a heparina são encontradas nas secreções do trato genital feminino em boas quantidades e são componentes importantes na capacitação tanto *in vivo* como *in vitro* (Killian et al., 1993; Yanagimachi, 1994). A heparina é uma glicosaminoglicana que estimula a capacitação dos espermática. Estudos têm indicado que a habilidade dos espermatozóides de se ligarem a heparina e outros GAGS presentes nos fluídos do trato genital está correlaciona-se com a fertilidade (Killian et al., 1993).

O conteúdo de colesterol está relacionado com a taxa de capacitação (Frits et al., 2000) e a taxa de capacitação espermática esta relacionada com a taxa de efluxo de colesterol da membrana plasmática. Espermatozóides de humanos e bovinos com alto conteúdo de colesterol requerem um maior período para capacitarem (respectivamente, 8 e 6h). Por outro lado os espermatozóides de suínos e ovinos com baixo conteúdo de colesterol, requerem unicamente 1 ou 2 horas para a capacitação (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

Não se espera que todos os espermatozóides de um mesmo ejaculado capacitem sincronicamente. Alguns podem capacitar mais rápido que outros mesmo em condições iguais. Além disso, espermatozóides de alguns machos podem capacitar consideravelmente mais rápido, ou mais facilmente, que aqueles oriundos de outros machos da mesma espécie (Yanagimachi, 1994). Subpopulações de espermatozóides podem ter pequenas quantidades de elementos que previnem o processo de capacitação ou poderiam prontamente perdê-los tornando-se aptos a capacitação mesmo sem diluição (Perez et al., 1997).

Atualmente, muitos pesquisadores têm relatado mudanças nos espermatozóides criopreservados semelhantes as que ocorrem durante a capacitação (Maxwell & Watson, 1996; Valcárcel et al., 1997; Gree & Watson, 2001) e, por isso, denominam criocapacitação. Para Ellington et al., (1999), esta capacitação que ocorre durante a criopreservação é de grande interesse no estudo

dessa técnica, já que estas alterações que os espermatozóides sofrem podem reduzir a longevidade da célula espermática criopreservada.

### **Reação acrossômica**

Quando os espermatozóides estão completamente capacitados e recebem o estímulo adequado, eles iniciam e completam rapidamente a reação do acrossoma. Assim, tem estabelecido que a capacitação é um pré-requisito para a reação acrossomal. A reação do acrossoma tem pelo menos duas funções: conferir aos espermatozóides a capacidade de atravessar a membrana pelúcida e se fundirem com a membrana plasmática do ovócito (Yanagimachi, 1994).

A reação do acrossoma consiste de uma elevação intra-espermática de mediadores iônicos da excitose que incluem  $Ca^{++}$  que provavelmente ocorre em resposta a um agonista estimulador. Em um estágio inicial a reação acrossomal é considerada por eventos de fusão e fendimentos de múltiplas membranas envolvendo a membrana acrossomal externa e membrana plasmática que a recobre o que resulta na formação de vesículas híbridas originárias de ambas as membranas e na perda do conteúdo acrossomal. Em um estágio mais adiantado, as vesículas híbridas são eliminadas da superfície dos espermatozóides e ocorre uma liberação mais intensa de conteúdo acrossomal, incluindo uma variedade de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, acrossina e hialuronidase que são essenciais para que tornem capaz a penetração do espermatozóide no ovócito (Frits et al., 2000).

A reação acrossomal tem sido usada como indicador da completa capacitação. Entretanto é preciso tomar cuidado com as condições não usuais ou reagentes especiais que podem induzir a reação acrossomal, desviando-se da capacitação. Contrariamente a isso, a ausência de reação acrossomal não significa que os espermatozóides falharam em sofrer a capacitação. Esses espermatozóides podem estar capacitados porem impedidos de sofrer a reação do acrossoma. Outros morrem mesmo antes de sofrerem ou completarem a capacitação.

### **Criopreservação de sêmen**

A criopreservação do sêmen dos mamíferos promove a redução da capacidade fecundante dos espermatozóides em relação ao sêmen fresco. Isto se deve, em primeiro lugar, porque de 40-50% dos espermatozóides criopreservados não

sobrevivem, mesmo utilizando eficientes protocolos de congelação, devido a modificações bioquímicas, funcionais e da estrutura da membrana plasmática, permanecendo apenas uma subpopulação de espermatozóides viáveis. Os danos criogênicos na bioquímica e na ultra-estrutura destas células podem ser os responsáveis pelo decréscimo da integridade funcional, sobrevivência e capacidade de fertilização (Salamon & Maxwell, 1995).

A desestabilização da membrana plasmática associada a refrigeração pode estar correlacionada ao aumento de fluidez da bi-camada lipídica da membrana o que a torna mais permeável favorecendo a entrada de cálcio livre no interior da célula, o qual por sua vez estimula o processo de capacitação (Watson, 1995). O processamento do sêmen ou a composição dos diluidores podem favorecer modificações na distribuição e características dos componentes de membrana que cobrem o espermatozóide, resultando em desestabilização da membrana plasmática que parece ser um requisito para a ocorrência da capacitação (Pérez et al., 1996). O processo de refrigeração, congelação e descongelação do sêmen antecipam a maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozóides capacitados ou com o acrossoma reagido em comparação ao sêmen *in natura* (Maxwell & Watson, 1996), tornando assim sua sobrevivência limitada porque os espermatozóides capacitados não possuem um período de vida prolongado, eles são ativados como preparação para o encontro com o ovócito e, se isso não ocorrer em curto tempo eles morrem (Watson, 1995).

A rápida redução da temperatura de 20°C para 0°C, ou choque térmico, leva a uma perda na integridade da membrana, prematura despolimerização dos filamentos de actina, ponto necessário, que permite a aproximação da membrana espermática ao folheto externo da membrana do acrossoma, contribuindo para a fusão desorganizada da membrana, promovendo a exocitose acrossomal (Watson, 2000). Se a refrigeração é feita de modo inadequado, os espermatozóides sofrem então choque térmico no qual vem a ocorrer danos decorrentes de alterações da membrana à medida que os espermatozóides progridem para as mudanças da fase de transição durante o resfriamento (Barrios et al., 2000).

Uma maior severidade nos danos da membrana espermática ocorre com maior intensidade no sêmen dos carneiros do que nos touros. No mesmo sentido, a perda de lipoproteínas e aminoácidos é maior nos carneiros que nos touros, após a



congelamento, bem como as perdas dos fosfolipídios, levando ao decréscimo da atividade da fosfatase, a qual diminui de 15-50% o colesterol ligado a proteínas. A criopreservação também aumenta o conteúdo de sódio e diminui a de potássio nos espermatozoides. (Holt, 2000).

Nos carneiros, alguns aspectos do processo de refrigeração, congelamento e descongelamento tornam a membrana espermática com maturação excessiva e aumentam a proporção de espermatozoides capacitados e acrossoma reagidos precocemente. As mudanças na membrana não afetam a motilidade, mas encurtam a sobrevivência espermática, levando a perda da fertilidade, ou a incapacidade de fertilizar. O envelhecimento dos espermatozoides capacitados no trato genital após a IA superficial agrava muito mais a situação (Salamon & Maxwell, 1995; Holt, 2000).

Com relação aos aspectos de congelamento do sêmen ovino utilizando diferentes diluentes, processamentos e curvas de congelamento se têm inúmeras informações, mas estão relacionadas com os danos as células na criopreservação e fertilidade. Altas concentrações de crioprotetores são tóxicas para as células que podem vir a resultar em queda da fertilidade (Salamon & Maxwell, 1995)

Características de motilidade dos espermatozoides antes e depois da criopreservação têm sido comparadas (Watson, 1995). Segundo Ollero et al. (1998) a motilidade espermática não diminuiu tão drasticamente após a refrigeração do sêmen ovino, ficando em média 60% aos +5°C. Entretanto, em relação a congelamento e descongelamento, observou uma perda mais séria da motilidade levando a uma perda total da motilidade. Peris et al. (2004) observaram que a congelamento diminuiu a porcentagem de espermatozoides com motilidade medidas pelo CASA.

Injúrias ocorridas nas membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais dos espermatozoides, ocasionadas pela criopreservação, são devido a alterações na temperatura e na osmolaridade do meio que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios dessas estruturas. As modificações ocorridas nas membranas durante a criopreservação causam como consequência, prejuízos na motilidade espermática, na produção de trifosfato de adenosina e diminuição da capacidade fertilizante ou até a morte celular (Celeghini, 2005).

Após a descongelamento do sêmen ovino, a integridade de membrana é drasticamente reduzida, enquanto que o efeito na motilidade não é tão evidente. A análise simultânea da integridade de membrana e a motilidade revelou a existência

de uma grande população de espermatozoides com danos de membrana que se apresentam móveis imediatamente após a descongelação. Os espermatozoides com danos de membrana embora móveis, perdem rapidamente a motilidade dentro de poucas horas de incubação a 37°C (Valcárcel et al., 1994). De acordo com Valcárcel et al., (1997) a membrana plasmática é mais frágil que a membrana acrossomal externa e parece ser consideravelmente mais frágil que as membranas mitocondriais, sendo assim, sua preservação é o ponto mais crítico para o sucesso da criopreservação.

### **Avaliação do sêmen**

A avaliação mais precisa para determinação da fertilidade de um reprodutor seria pela prenhez após um acasalamento ou IA. Entretanto, este método seria inviável para uma avaliação de rotina devido ao requerimento de muito tempo para obtenção do resultado e pelo seu custo bem como pela interferência da fertilidade da fêmea. O exame andrológico que é utilizado para avaliar um reprodutor baseado nos aspectos clínicos, comportamentais e nas características físicas e morfológicas do sêmen é capaz de identificar a maioria dos casos de infertilidade e sub-fertilidade. No entanto, vários problemas reprodutivos não são detectados pelo exame andrológico, pois este exame não avalia a habilidade dos espermatozoides em sofrer processos relacionados com a funcionalidade, como a capacitação espermática, reação do acrossoma e fecundação. Para esse tipo de avaliação utilizam-se algumas técnicas ou combinações de varias técnicas, que tornariam possível uma estimativa mais precisa da fertilidade. Sendo que vários testes *in vitro* têm sido desenvolvidos e utilizados como avaliação da integridade de membrana, avaliação da integridade de acrossoma, avaliação da motilidade computadorizada, avaliação da capacitação espermática, teste de ligação de zona pelúcida e fecundação *in vitro*.

### **Motilidade e vigor espermático**

A motilidade e o vigor são testes rotineiramente utilizados para avaliação da viabilidade espermática. São de rápida execução, baixo custo e aplicáveis no

campo. No entanto, deve-se destacar que não consistem parâmetros por si só tenham uma estrita correlação com a fertilidade, principalmente com sêmen criopreservado, pois, estão sujeitas a influência de fatores como temperatura da amostra, volume da gota, tempo de preparo da lâmina e diferentes critérios de avaliação entre examinadores.

### **Morfologia espermática**

O exame morfológico do sêmen tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle da qualidade do sêmen ovino. Os defeitos de morfologia dos espermatozoides podem ser divididos em defeitos maiores e defeitos menores. O ejaculado pode conter uma elevada proporção de espermatozoides anormais, assim sendo considerado um ejaculado de baixa qualidade e podendo afetar a fertilidade.

Para efeito de julgamento do sêmen descongelado de reprodutores, foram estipulados os padrões máximos de anormalidades espermáticas de 20% e 10% para defeitos totais e defeitos maiores respectivamente (Henry & Neves, 1998).

### **Integridade de membrana**

A integridade e a funcionalidade das membranas espermáticas são de fundamental importância visto que uma membrana intacta e funcionalmente ativa é requerida para o metabolismo espermático, capacitação, reação do acrossoma, ligação e penetração do ovócito. Deste modo, a avaliação do “status” das membranas espermáticas parece ser um importante parâmetro para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides. Essa avaliação é fundamental quando se refere a amostras que foram submetidas a refrigeração e congelamento, pois todo esse processo realizado tem efeitos adversos nas membranas dos espermatozoides, incluindo a membrana plasmática, a membrana acrossomal e a membrana mitocondrial (Rodriguez-Martinez et al., 1997).

Dentre as técnicas de avaliação destacam-se as sondas fluorescentes com grande ênfase, por suas características de marcarem estruturas específicas das células e detectarem integridade estrutural ou funcional de forma clara, como as que utilizam os corantes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP).

O IP é um marcador de DNA para células mortas o qual é excluído pela membrana plasmática de células normais, o FDA atravessa a membrana plasmática de células vivas (Anzar et al., 1997).

### **Integridade do acrossoma**

O acrossoma é importante por conter enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração dos ovócitos e estão intimamente associados a fertilização (Rodrigues-Martinez et al., 1997).

Quando lesados, facilitam a penetração de certos corantes que permitem a mensuração da proporção de espermatozóides afetados. Neste sentido, o método de coloração baseado no Trypan Blue-Giemsa favorecem uma estimativa confiável da proporção de espermatozóides vivos e com acrossoma estruturalmente íntegro, além de ser de fácil aplicabilidade e possuir critérios bem definidos quanto a identificação visual. Este método tem sido efetivo para estudos da função acrossomal e suas relações com a capacidade fertilizante do sêmen bovino (Tartaglicone & Ritta, 2004)

### **Plasma seminal**

O plasma seminal é o produto das secreções sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais, glândulas bulbo-uretrais) bem como, dos epidídimos, condutos deferentes e ampolas dos ductos deferentes. O plasma seminal se integra aos espermatozóides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas (Evans & Maxwell, 1990). A sua composição inclui aminoácidos, açúcares, ácido cítrico, minerais, fosfatases, prostaglandinas e proteínas de uma faixa ampla de massa molecular (Evans & Maxwell, 1990).

Os principais íons do plasma seminal são: sódio, potássio, cloreto, cálcio e o magnésio. O sódio e o potássio se encontram em maior concentração e o cálcio e magnésio em menor quantidade. Alguns relatos indicam que o potássio está correlacionado com a viabilidade espermática (Hafez & Hafez, 2000). O cálcio é um importante regulador da fisiologia espermática. Está envolvido em várias etapas da maturação, capacitação, e da reação acrossomal dos espermatozóides. Há relação

entre as concentrações de cálcio total e ionizado ( $\text{Ca}^{++}$ ) e a motilidade progressiva dos espermatozóides (Kiliç et al., 1996). As glândulas vesiculares também secretam pequenas quantidades de outros açúcares como a glicose, sorbitol, inositol, ribose e frutose (Hafez & Hafez, 2000).

O plasma seminal auxilia positivamente na fertilidade, servindo de diluente e veículo para os espermatozóides e exercendo efeitos estimulantes na motilidade espermática durante a ejaculação, é fonte de energia para o espermatozóide, tem capacidade tamponante e mantém a integridade da membrana celular dos espermatozóides (Maxwell & Johnson, 1999). O plasma seminal é importante na promoção da fertilidade, pois possui proteínas, que se ligam aos espermatozóides, e que podem influenciar positivamente na capacidade de fertilização da célula. Porém, fatores que interferem negativamente na fertilidade já foram identificados no plasma seminal como a seminaplasmina bovina e o fator 1 da antifertilidade humana, que inibem a capacitação ou a reação acrossômica, interferindo na fertilidade (Killian et al. 1993).

O plasma seminal também atua modulando a reação acrossômica, evitando que esta ocorra prematuramente, o que levaria a falhas na fertilização (Lausmann 2002; Silva et al., 2005). Isto ocorre devido aos “fatores decapacitantes” presentes no plasma seminal que previnem o desencadeamento do processo de capacitação dos espermatozóides por meio da estabilização da membrana plasmática, tanto pela maturação da razão colesterol/fosfolípidios quanto pelo bloqueio da calmodulina, a qual facilita o transporte transmembrânico de cálcio (Fraser, 1998).

Proteínas que tem afinidade pela heparina denominadas HBP (heparin binding proteins) são produzidas pelas glândulas acessórias e secretadas no plasma seminal. Essas proteínas se ligam a membrana plasmática dos espermatozóides quando estes entram em contato com o plasma seminal. Uma vez ligados a essas proteínas, os espermatozóides adquirem receptores específicos, através dos quais respondem ao efeito da capacitação pela heparina (Muller., 1990).

Novos estudos têm demonstrado a importância do plasma seminal em diferentes espécies. Em bovinos, Henault & Killian (1996) notaram aumento na taxa de penetração de ovócitos por espermatozóides de animais de baixa fertilidade devido à adição de plasma seminal de animais de alta fertilidade, estes autores demonstraram que a capacidade de espermatozóides colhidos da cauda do

epidídimo de touros de baixa fertilidade em penetrar ovócitos aumenta significativamente quando expostos aos fluidos das glândulas sexuais acessórias de touros de alta fertilidade. Na espécie eqüina, a adição de plasma seminal de garanhões de alta fertilidade em espermatozóides de animais de baixa fertilidade elevou a resistência dos espermatozóides a congelação e descongelação, concluindo que a composição do plasma seminal é um fator que determina a suscetibilidade individual de garanhões para a criopreservação do sêmen (Aurich & Hoppe, 1996).

Diversos autores procuram marcadores para a fertilidade ou infertilidade em machos de várias espécies, sendo as proteínas do plasma seminal um dos principais alvos de estudos. Sua presença, ausência ou concentração no plasma seminal é responsável pela fertilidade espermática (Henault & Killian, 1996). Para a separação e identificação dos componentes protéicos do plasma seminal podem ser utilizadas a gel filtração, a eletroforese unidimensional e a eletroforese bidimensional (Killian et al., 1993; Fraser, 1998).

### **Inseminação artificial**

Os primeiros ensaios sobre IA em ovinos foram realizados no início do século XX por Ivanov que analisou meios diluentes e a reprodução assistida visando desenvolver um método prático de inseminação nas fazendas. Depois da Primeira Guerra Mundial, com estudos mais intensivos, a IA com sêmen fresco e refrigerado passou a ser usada em larga escala em programas reprodutivos ovinos (Salamon & Maxwell, 2000). Quando a IA é aliada à teste de progênie pode-se aumentar substancialmente a qualidade dos produtos obtidos devido à melhoria do mérito genético dos rebanhos (Naqvi et al., 1998). Paralelamente a IA com sêmen a fresco, houve o desenvolvimento de biotécnicas relacionadas a preservação do sêmen, seja através da refrigeração ou da congelação (Maxwell & Warson, 1996). Naqvi et al. (2001) relataram que a preservação do germoplasma pode ser a maior contribuição na manutenção da biodiversidade, permitindo a conservação de reprodutores de genética superior e em extinção e com a IA pode-se potencializar em maior número a disseminação desses materiais.

Atualmente em ovelhas, maiores índices de fertilidade são obtidos após IA por via laparoscópica realizando a colocação do sêmen diretamente no útero, sendo considerada a técnica responsável pela expansão do uso do sêmen congelado nesta espécie (Eppleston & Maxwell, 1993). Todavia, esta técnica ainda apresenta limitada aplicação comercial devido a seu custo elevado e mão-de-obra qualificada (Halbert et al., 1990). Outra técnica empregada é a IA cervical, tendo como maior dificuldade a passagem do instrumento de inseminação através da cérvix, essa que apresenta pregas cartilaginosas dispostas em diferentes planos e direções, dificultando a sua transposição (Maia, 1999) e a utilização de sêmen congelado, obtendo uma fertilidade baixa depois da IA cervical estando relacionado à inabilidade dos espermatozóides em atravessar a cérvix após ser submetido a congelação e descongelação (Windsor 1995) levando assim uma pequena população de espermatozóides viáveis ao local de fertilização (Evans & Maxwell 1990).

Em bovinos, o sucesso da IA é ter sêmen congelado de melhor qualidade e este ser depositado diretamente no útero por via cervical durante a inseminação, tendo resultados de prenhez satisfatórios (Upreti et al., 1995).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Investigar “*in vitro* e *in vivo*” o efeito da adição do plasma seminal após a descongelação de sêmen ovino.

### **Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da adição do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino na motilidade espermática e integridade de acrossoma em vários períodos de incubação.

Avaliar o efeito da adição do plasma seminal na descongelação de sêmen ovino na IA cervical em ovelhas com estro sincronizado.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-HAILA, A., TULSIANI, D.R.P. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents and Function. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, Paris, v. 379, n. 2, p. 173-182, 2000.
- AISEN, E. G., MEDINA, V. H., VENTURINO, A. Evaluación del semen ovino congelado en distintas concentraciones de trealose. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Rio Negro, v.23, p.282-283, 1999.
- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. **Equine Reproduction**, Malvern p. 715-745, 1993.
- ANZAR, M., GRAHAM, E. F., IQBAL, N. Post-Thaw membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. **Theriogenology**, v. 47, p. 845-856, 1997.
- AURICH, J. E.; HOPPE, H.; Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v.46, p.791-797, 1996.
- AUSTIN, C.R., SHORT, R. V. Reproduction in mammals – **Germ Cells and Fertilization**. New York: Cambridge University Press, v. 1, 1990, 177p.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J., Seminal plasma proteins revert the cold-sock damage on ram sperm membrane, **Biology of Reproduction**, 63, 1531-1537, 2000.
- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sodas fluorescentes. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga. 186p. 2005.
- CROSS. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology Reproduction.**, Oklahoma, v.59, p.7-11, 1998.
- DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**. v.63 p.319-341, 2005.
- EDDY, E.M., O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: Knobil, E., Neill, J.D. **The Physiology of Reproduction** New York: Raven Press, p. 29-77, 1994.
- ELLINGTON, J.E.; SAMPER, J.C.; JONES, A.E.; OLIVER, S.A.; BURNETT, K.M.; WRIGHT, R.W. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells of their secretory products. **Animal Reproduction Science**. v. 56 p.243-255, 1999.

EPPLESTON, J., MAXWELL, W. M. C. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix. **Wool Tech. Sheep Breed.** Kensington, v.41, p.291-302, 1993.

EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras.** Zaragoza : Acribia, 1990. 191p.

FRANCA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology.** v.63 p.300-318, 2005.

FRASER, L. R. Interactions between a decapacitation factor and Mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. **Mol. Reproduction Desenvolment.** v.51, p. 193-200, 1998.

FRITS, M., FLESCHE, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta.** Utrecht, v. 1469, p.197-235, 2000.

GADELLA, B.M., RATHI, R., BROUWERS, J.F.H.M. Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science.** V. 68, p. 249-265, 2001.

GREE, C.E.; WATSON, P.F. Compararison of the capacitation-like satate of cooled boar spermatozoa with trae capacitation. **Reproduction,** v 122, p.889-898, 2001.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals.** 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,509p, 2000.

HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., SHARPE, P., BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology,** v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.

HEALEY, P. Effect of freezing on the ultra structure of the spermatozoon of some domestic animals. **J. Reprod. Fert.,** London, v.18, p.21-27, 1969.

HENRY, M.; NEVES, J. P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA),** 1998, 79p.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Jornoul Reproduction Fertility.** v.108, p.199-204, 1996.

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

HOLT, W.V., NORTH, R. D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. **Gamete Res;** v 19; 77-89, 1998.

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

KILIÇ, S., SARICA, K., YAMAN, O. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. *Urol. Int. Kyoto*, v. 56, p.215-218, 1996.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **J Membr Biol** vol 1, p.165,1998:

LAUSMANN, C. V. Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. **(Dissertação Mestrado)**, Universidade Federal de Santa Maria, 57p. 2002.

MAIA, M. S. Inseminação artificial em ovinos. In: **Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária. Recife. Anais** p.147-150, 1999.

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.; JOHNSON, L.A.; Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma, **Theriogenology**, 52: 1353-1362, 1999.

MULLER, D. J. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology Reproduction.** v.42, p.899-915, 1990.

NAABY-HANSEN, S., FLICKINGER, C. J., HERR, J. C. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology Reproduction**, v. 56, p. 771-787, 1997.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; BAG, S.; MITTAL, J.P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research.** v. 29, p.329-333, 1998.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; BAG, S.; MITTAL, J.P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research.** v.39, p.199-208, 2001.

NEVES, J. P. Novas técnicas da inseminação artificial em ovinos. *In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, Caprinocultura e Ovinocultura, 1990, Campinas – SP. Anais...*Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990, p.57-67.

OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reprod. Fertil. Dev.**, Zaragoza, v.9, p. 381-390, 1997.

OLLERO, M.; PERÉZ-PE, R.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN PEREZ, J. A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology.** v.37, p.1-12, 1998.

PARKS, E. J.; HAMMERSTEDT, H. R. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrana. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.

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

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE,H., Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay, **Theriogenology**, 46: 131-140, 1996.

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE,H. The storage of purê ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 47, p. 549-558, 1997.

PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**. v.25, n.2, 2004.

QUINN, P.J., CHOW, P. Y W., WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold-shock at a plasma membrana site. **J. Reprod. Fétil**; 60: 403-407, 1980.

RATHI, R., COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**., Utrecht, v. 65, p.462-470, 2001.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evulation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p 297-308, 1997.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.62, p.77-111, 2000.

SILVA, T.A.S.N., NEVES, J.P., NETO, A.G.G., GUIMARÃES, A.P., RUMPF, R., SARTORI, R. Viabilidade e estado acrossomal do sêmen ovino descongelado e incubado com plasma seminal. **Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – XVI CBRA** Goiânia, 2005.

SILVA, P. F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**. v.65, p.958-978, 2006.

SINGER, S. J., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. **Science** n. 175, p. 720-731. 1972.

SOUZA, M.I.L. A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado. **(Dissertação de Mestrado)** – Universidade Federal de Santa Maria, 47p, 1993.

STRYER, L. Introduction to biological membranes. **Biochemistry**. 3 ed. New York. p. 283-310. 1988.

TARTAGLIONE C. M., RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in Vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62 p.1245-1252. 2004

TOPFER-PETERSEN, PETROUNKINA, A.M. Oocyte-sperm interactions. **Animal Reproduction Science**, V. 60-61, p. 653-662, 2000.

TULSIANI, D. R. P., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 487 – 494, 1997.

UPRETI, G. C., OLIVER, J. E., DUGANZICH, D.M., MUNDAY, R., SMITH, J. F. Development of a chemically defined ram semen diluent. **Animal Reproduction Science**. v.37, p.143-157, 1995.

VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489, 1994.

VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45 p. 299-309, 1997.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**. v.7, p.871-891, 1995.

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

WINDSOR, D. P. Factors influencing the success of transcervical insemination in merino ewes. **Theriogenology**. v.43, n.6, p. 1009-1018, 1995.

YANAGIMACHI, R., Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. **The Physiology of Reproduction** New York: Raven Press, 1994.

**VIABILIDADE E ESTADO ACROSSOMAL DO SÊMEN OVINO  
DESCONGELADO E INCUBADO COM PLASMA SEMINAL**

**VIABILITY AND ACROSSOMA STATUS OF FROZEN-THAWED RAM SEMEN  
WITH ADDITION OF SEMINAL PLASMA**

Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva<sup>I\*</sup>; Ana Paula Guimarães<sup>II</sup>, Anísio  
Guimarães Neto<sup>II</sup>, Roberto Sartori<sup>III</sup>, José Robson Bezerra Sereno<sup>III</sup>, Rodolfo Rumpf<sup>III</sup>  
,Jairo Pereira Neves<sup>IV</sup>

<sup>I\*</sup> Pós-graduação em Ciências Agrárias, Produção Animal, da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB; Campus Universitário Darcy Ribeiro,  
Brasília - DF, CEP 70 910-900; [tasnsilva@yahoo.com.br](mailto:tasnsilva@yahoo.com.br) Autor para  
correspondência.

<sup>II</sup> Graduação na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB

<sup>III</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa – Recursos Genéticos e  
Biotecnologia – Cenargen.

<sup>IV</sup> Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília.

**Trabalho submetido a revista Ciência Animal Brasileira**

## RESUMO

O sêmen ovino quando submetido ao processo de refrigeração, congelação e descongelação sofre vários danos espermáticos, tais como alterações na membrana espermática, queda na motilidade e aumento nas proporções de espermatozóides capacitados e com acrossoma reagidos precocemente. Com o objetivo de investigar o efeito do plasma seminal (PS) na proteção contra a reação prematura do acrossoma, após sua adição na descongelação e incubação. Utilizou-se sêmen de 3 reprodutores. O PS foi coletado de machos vasectomizados submetido à centrifugação e armazenamento a - 20°C. As amostras foram descongeladas e incubadas em PS e em solução salina fosfatada (PBS). Para análise utilizaram-se os parâmetros motilidade, vigor e integridade do acrossoma, todos avaliados nos períodos de incubação (0, 2, 4 e 6 hs). Quanto a motilidade não houve diferença significativa entre os tratamentos. Com relação à integridade do acrossoma a adição do PS proporcionou uma média superior de espermatozóides vivos com acrossoma integro ( $P < 0,05$ ) em relação ao tratamento com PBS nas 2 e 6 horas de incubação. Concluindo, a adição do PS na descongelação de sêmen de carneiro exerceu efeito protetor sobre os espermatozóides prevenindo assim uma reação precoce do acrossoma.

**Palavras Chaves:** congelação, plasma seminal, reação do acrossoma, incubação.

## ABSTRACT

The process of ram semen cooling, frozen and thawing cause many damages such as changes in membrane components, low motility and increase of capacitation spermatozoa and premature acrossome reaction. The aim of the present experiment was to evaluate the effect of the seminal plasma on protect against premature acrossome reaction, after its addition on thawed semen e incubation period. Semen was collected from 3 ram. The seminal plasma was collected from vasectomized ram, centrifuged and storage at -20°C. The samples was thawed and resuspended with seminal plasma or in PBS. The evaluates after thawed was motility, vigor and acrossome integrity, all during the incubation period (0, 2, 4 e 6 hours). There wasn't difference to motility among treatments. The acrossome integrity with seminal plasma showed higher average of spermatozoa alives with acrossoma intact ( $P < 0,05$ ) than PBS treatment at 2 and 6 hours of incubation period. In conclusion the addition of seminal plasma on frozen-thawed ram semen had a protector effect on spermatozoa avoiding the premature acrossome reaction.

**Key Words:** frozen-thawed semen, seminal plasma, acrossome reaction, incubation.



## INTRODUÇÃO

A técnica de inseminação artificial (IA) é a ferramenta que quando criteriosamente executada, proporciona um incremento rápido de multiplicação de indivíduos portadores de genes superiores. A IA por laparoscopia atualmente promove resultados de fertilidade expressivos, e é considerada também responsável pela expansão da utilização do sêmen congelado em ovinos (Maia 1999), mas apresenta limitações devido ao seu elevado custo quando utilizada em rebanhos comerciais resultando em um custo alto por cordeiro nascido (Halbert et al., 1990). A técnica de IA cervical é de custo baixo podendo ser aplicada em um maior número de propriedades, mas que possui entraves, os quais consistem na dificuldade de transposição da cérvix da ovelha pela sua característica anatômica dificultando a passagem do aplicador de sêmen, ocorre também uma inabilidade dos espermatozoides criopreservados em atravessar a cérvix, principalmente pela baixa motilidade, alterações de membrana, capacitação e reação do acrossoma precoce provocadas pelo processo de criopreservação (Maxwell & Watson, 1996, Valcárcel et al., 1997; Holt, 2000). Preservar a integridade e funcionalidade do espermatozoide é crucial para a manutenção de sua capacidade fertilizante em especial após todo o processo de criopreservação do sêmen ovino.

Alguns estudos, realizados nos últimos anos, têm demonstrado que o PS melhora a viabilidade espermática evitando a capacitação e reação precoce do sêmen ovino criopreservado quando adicionado na descongelação (Maxwell et al., 1999; Lausmann et al., 2002). Maxwell et al (1999), utilizando a ressuspensão de 20 a 30% de PS diluído em PBS em sêmen descongelado ovino após a centrifugação, obtiveram um incremento dos índices de prenhez após aplicação cervical superficial.

Lausmann et al. (2002), verificando os efeitos do PS adicionados na descongelação com diversas concentrações sobre o estado de capacitação espermática avaliado pela clortetraciclina, observaram que concentrações acima de 75% de PS permitem a efetiva proteção espermática. Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito do PS quando adicionado na descongelação de sêmen ovino, na proteção e reação precoce do acrossoma.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado na Fazenda Experimental Sucupira, Brasília – DF. Foram utilizados três carneiros da raça Santa Inês como doadores de sêmen e um carneiro (SRD) vasectomizado para a coleta de PS. Todos os animais foram avaliados e apresentaram saúde geral, genital e reprodutiva satisfatórios, com idades de 2 e 3 anos, receberam o mesmo regime de alimentação (feno de coast-cross, silagem e sal concentrado). Antes do início do experimento, foram submetidos a coletas de sêmen e todos apresentaram características espermáticas dentro dos padrões requeridos para criopreservação de sêmen, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

Cada reprodutor foi submetido a seis coletas, as quais foram realizadas uma vez por semana durante o período experimental. Os ejaculados foram coletados com vagina artificial, tendo como manequim uma fêmea em estro e analisados considerando os seguintes itens: coloração, aspecto, odor, volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática. Os ejaculados só foram liberados

para a criopreservação com os seguintes padrões mínimos: volume de 0,5 ml, motilidade espermática de 70%, vigor 3 e concentração espermática de  $3 \times 10^9$  spz/ml.

A seguir os ejaculados foram diluídos na proporção de 1:2 (sêmen/meio diluidor) em um meio diluidor a base de tris-gema (Evans & Maxwell, 1990), e mantidos em um banho-maria a +35 °C até o término das avaliações. A refrigeração do sêmen foi realizada em um refrigerador a +5 °C por um período de 120 minutos. Após este período o sêmen foi congelado em *pellets* em um volume de 130µl, sobre uma bandeja com gelo seco (-79 °C), por 6 minutos e imediatamente depositado em tubos plásticos identificados e submersos em nitrogênio líquido para finalmente serem transferidos para um botijão de nitrogênio.

O PS foi coletado uma vez por semana pelo método de eletroejaculação, centrifugado (600g/10 minutos). O sobrenadante foi acondicionado em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml e armazenado a -20 °C.

Para a avaliação as amostras foram descongeladas a +37 °C, e incubadas, por 6 horas, na mesma temperatura em um banho-maria, com PBS (Tratamento 1) e PS (Tratamento 2) em uma proporção de 1:1 (sêmen descongelado/ PBS ou PS). Os parâmetros avaliados foram a motilidade espermática e a integridade de acrossoma, retirando-se amostras após 0, 2, 4 e 6 horas de incubação. A motilidade foi avaliada em microscópio com contraste de fase em objetiva de 20x, para cada tratamento e hora determinada. A viabilidade espermática e a integridade de acrossoma foram avaliadas pela coloração Trypan Blue e Giemsa descrita por Didion et al. (1989).

Para cada amostra foram contadas 200 células por lâmina e os espermatozóides encontrados classificados conforme o seguinte critério:

- Espermatozóides mortos com acrossoma intacto (MI).

- Espermatozóides mortos com acrossoma reagido (MR).
- Espermatozóides vivos com acrossoma intacto (VI).
- Espermatozóides vivos com acrossoma reagido (VR).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados considerando o Delineamento em Parcelas Subdivididas (Sampaio, 1998). No delineamento utilizou-se 3 indivíduos, 6 partidas que foram submetidos a dois tratamentos, observados em 4 diferentes tempos. A análise estatística dos dados foi feita através de uma Análise de Variância, usando o procedimento GLM do Sistema estatístico SAS (SAS, 2003). Para o teste múltiplo entre as médias adotou-se o teste t, ao nível de significância de 5%. No estudo das interações significativas adotou-se a opção LSMEANS (Teste pdiff). As interações de interesse foram representadas por tabelas e visualizadas por meio de gráficos usando o Excel.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O processo de criopreservação de espermatozóides causa alterações em sua estrutura e função, o que vem resultar em uma reduzida capacidade de fertilização quando comparado com o sêmen fresco. Nos carneiros, ocorre antecipação da maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozóides capacitados ou com acrossoma reagido em comparação ao sêmen

fresco (Maxwell et al., 1996). Desta forma, estudos vêm sendo desenvolvidos para tentar inibir o processo de capacitação precoce dos espermatozóides ovinos submetidos a criopreservação. Dentre eles vem sendo utilizado a adição de PS (Maxwell et al 1999).

Quanto à influência da adição do PS na descongelação de sêmen ovino na avaliação do parâmetro motilidade não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos ao longo do período de incubação (tabela 1.1).

Os resultados não corroboram com o que foi encontrado por Maxwell et al., 1999; El-Hajj Ghaoui et al., 2006 no qual o PS aumentou os parâmetros de motilidade em relação ao grupo controle. Quando, observando o período de incubação de (0, 2, 4 e 6hs) em cada tratamento ficou evidenciado uma queda da motilidade ( $P<0,05$ ) no decorrer do tempo de incubação para os dois tratamentos (Tabela 1.1) corroborando com os relatos de Rodello (2006), Azevedo (2006).

A redução da motilidade durante a incubação pode estar ligada a diminuição gradual da habilidade do espermatozóide em produzir ATP através da respiração mitocondrial como consequência de danos ao metabolismo energético e consequente morte celular (Celeghini, 2005) e também essa perda pode ser provocada pelos efeitos tóxicos de espécies oxigênio reativas (ROS) oriundas do metabolismo dos espermatozóides. O ROS pode vir a causar um declínio no metabolismo de energia, redução da motilidade e viabilidade espermática e a desnaturação do DNA (Baumber et al., 2000). Segundo Salamon & Maxwell (1995) apesar de espermatozóides ovinos pós-descongelação, apresentarem 40 a 60% de motilidade, apenas 20 a 30% dos mesmos permanecem biologicamente sem danos, ou seja, um espermatozóide pode ser móvel, porém danificado. Windsor (1997)

afirma que a motilidade pós-descongelamento, seja ela avaliada subjetivamente ou objetivamente, não é um bom indicador da função metabólica do sêmen.

Quanto à porcentagem de espermatozoides vivos com o acrossoma íntegro (VI) o tratamento, com PS foi superior ( $P < 0,05$ ) em relação ao PBS, na segunda hora de incubação ( $43,4 \pm 0,9$  vs  $37,5 \pm 11,8$ ) e também na sexta hora de incubação ( $21,8 \pm 0,6$  vs  $16,3 \pm 0,7$ ) (Tabela 1.2).

Ficou evidenciado que o PS foi efetivo protetor da integridade do acrossoma, prevenindo uma reação de acrossoma precoce. O acrossoma íntegro contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração ovocitária e estão intimamente associados à fertilização. Maxwell et al. (1999), demonstraram que, após a adição do PS, a motilidade dos espermatozoides de carneiros descongelados era melhor e houve menos células capacitadas e de acrossoma reagido (ambos analisados pela coloração de CTC) em comparação com grupo controle sem PS. Na presença do PS, os espermatozoides descongelados também aumentam sua capacidade de penetração no muco cervical comparado ao grupo sem PS e a fertilidade depois da IA cervical de ovelhas foi significativamente aumentada. Nos relatos de Lausmann et al. (2002), ficou evidenciado que a adição do PS após a descongelamento exerceu efeito protetor sobre os espermatozoides não capacitados, assim como também Barrios et al. (2000) demonstraram que adição de PS em espermatozoides refrigerados, que sofreram um choque térmico, melhorou significativamente sua sobrevivência. Marco-Jiménez et al. (2005) comparando os métodos de coleta de sêmen em carneiros com vagina artificial e eletroejaculação, demonstraram que o número de células não capacitadas com acrossoma intacto foi superior no método de eletroejaculação. Estes autores relataram como hipótese, que com o estímulo

elétrico sobre as glândulas sexuais proporcionaram maior volume de PS trazendo benefícios aos espermatozóides.

Com relação à porcentagem de espermatozóides mortos com acrossoma íntegro (MI) houve uma diferença ( $P < 0,05$ ) a favor do PS, ocorrendo um número maior de espermatozóides MI a partir da segunda hora de incubação no tratamento PS em relação ao tratamento com PBS (Tabela 1.2). Acredita-se que os espermatozóides tenham sofrido danos no seu metabolismo energético com perda da viabilidade celular (Vishwanath et al., 1997) no decorrer do tempo de incubação. Essa superioridade de espermatozóides MI no tratamento com PS, pode estar relacionada com a migração dos espermatozóides VI que perderam sua viabilidade celular passando a ser um espermatozóide MI no decorrer do tempo de incubação, mostrando também que esse espermatozóide se manteve íntegro pelo efeito do PS exercendo um efeito protetor para a reação do acrossoma.

Observando o tratamento com PBS teve uma porcentagem superior ( $P < 0,05$ ) de espermatozóides mortos com acrossoma reagido (MR) e espermatozóides vivos com acrossoma reagido (VR) em relação ao tratamento com PS no decorrer do tempo de incubação. Isso demonstra que houve perda da viabilidade celular e uma maior porcentagem de espermatozóides com reação de acrossoma.

Com base nestes resultados, pode-se concluir que a adição do PS na descongelação de sêmen de carneiro exerce efeito protetor sobre os espermatozóides criopreservados prevenindo assim uma reação precoce do acrossoma. Ficou também evidenciado que a coloração dupla Trypan blue/Giemsa é, um corante de fácil aquisição, baixo custo que pode ser utilizado em microscópio de campo claro e foi eficiente na avaliação da viabilidade e estado do acrossoma. Outros trabalhos serão necessários para se determinar os fatores presentes no PS

dos carneiros, sendo caracterizadas, sintetizadas e utilizadas como aditivos para meios de preservação de sêmen almejando melhoras nos índices de fertilidades de ovelhas na IA cervical.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, H. C.; MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Cinética e integridade dos espermatozóides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelação em sistema automatizado. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16., 2005.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **J Andrology**. v 21 p.895-902, 2000.

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

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sodas fluorescentes. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga. 186p. 2005.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2 ed., Belo Horizonte, CBRA, 1998: 49p.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J. R.R; GRAVES, C.N., Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamet Res.**, 22 (1), 51-57, 1989.

EL-HAJJ GHAOUI, R.E.H.; GILLIAN, L.; THOMSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C., Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomised rams on the

motility characteristics, membrane status and in vitro fertility of ram spermatozoa, **Journal of Andrology**, submetido em 23 de Agosto, 2006.

HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., SHARPE, P., BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.

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

LAUSMANN, C. V. Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. **(Dissertação Mestrado)**, Universidade Federal de Santa Maria, p.57. 2002.

MAIA, M. S. Inseminação artificial em ovinos. In: **Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária. Recife. Anais** p.147-150, 1999.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES,S.; GADEA,J.; VICENTE,J.S.; VIUDES-DE-CASTRO,M.P., Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa, **Theriogenology**, 64, 1756-1765, 2005.

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.; EVANS, G.; MORTIMER, S. T.; GILLAN, L.; GELLATLY. E.E.; McPHIE, C. A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v. 11, p. 123-126, 1999.

RODELLO, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 70p 2006.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal, Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 1998.

SAS Statistical Analysis System, User Guide, Caru Indiana, 2003, 295p.

VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARE, H. Assessment of acrossomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45 p. 299-309, 1997.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction Fertility Dev.** v.9 p.321-331, 1997

WINDSOR, D. P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reproduction Fertility and Development.** v.9, 279-284, 1997.

Tabela 2.1: Médias ( $\pm$  desvio padrão) da motilidade espermática, entre tratamentos com PBS e PS, em quatro momentos de incubação à 37 °C.

Parâmetro	Tratamento	Período de Incubação (h)			
		0	2	4	6
<b>Motilidade</b>	<b>PBS</b>	58,6 $\pm$ 11,6 <sup>a</sup>	49,2 $\pm$ 12,0 <sup>b</sup>	32,9 $\pm$ 13,9 <sup>c</sup>	20,4 $\pm$ 0,7 <sup>d</sup>
	<b>PS</b>	57,3 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	47,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	31,5 $\pm$ 13,8 <sup>c</sup>	19,2 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ; ANOVA, teste t), entre os tratamentos durante o teste de termo-resistência;

a, b, c, d, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ ; ANOVA, teste t)

Tabela 1.2: Médias ( $\pm$  desvio padrão) da integridade de acrossoma, entre tratamentos com PBS e PS, em quatro momentos de incubação à 37°C. Avaliados pelos parâmetros de espermatozoides vivos íntegros (VI), vivo reagido (VR), morto íntegro (MI) e morto reagido (MR).

Parâmetro	Tratamento	Tempo de incubação (h)			
		0	2	4	6
VI (%)	PBS	49,2 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	37,5 $\pm$ 11,8 <sup>Bb</sup>	26,2 $\pm$ 11,2 <sup>c</sup>	16,3 $\pm$ 0,7 <sup>Bd</sup>
	PS	49,4 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	43,4 $\pm$ 0,9 <sup>Ab</sup>	29,6 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	21,8 $\pm$ 0,6 <sup>Ad</sup>
VR (%)	PBS	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	5,2 $\pm$ 0,2 <sup>Bb</sup>	7,4 $\pm$ 0,3 <sup>Bc</sup>	8,4 $\pm$ 0,5 <sup>Bd</sup>
	PS	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>	4,8 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>
MI (%)	PBS	42,1 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	40,2 $\pm$ 11,3 <sup>Ba</sup>	46,7 $\pm$ 0,3 <sup>Bd</sup>	50,1 $\pm$ 16,7 <sup>Bd</sup>
	PS	41,2 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	44,0 $\pm$ 0,9 <sup>Aa</sup>	51,1 $\pm$ 10,6 <sup>Ab</sup>	58,7 $\pm$ 13,8 <sup>A</sup>
MR (%)	PBS	7,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	13,0 $\pm$ 0,8 <sup>Ab</sup>	20,1 $\pm$ 0,8 <sup>Ac</sup>	24,2 $\pm$ 11,1 <sup>Ad</sup>
	PS	6,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	9,5 $\pm$ 0,9 <sup>Ba</sup>	15,2 $\pm$ 0,5 <sup>Bb</sup>	18,5 $\pm$ 13,2 <sup>Bb</sup>

a, b, c, d diferentes, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ , ANOVA, teste t).

A, B, diferentes, na mesma coluna, diferem ( $P < 0,05$ , ANOVA, teste t).

## CAPÍTULO 2

# **USO DO PLASMA SEMINAL NA DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO PARA INSEMINAÇÃO TRANSCERVICAL EM OVELHAS COM ESTRO SINCRONIZADO**

Trabalho submetido à publicação na revista *Theriogenology*, Elsevier, Estados Unidos

# **USO DO PLASMA SEMINAL NA DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO PARA INSEMINAÇÃO TRANSCERVICAL EM OVELHAS COM ESTRO SINCRONIZADO**

## **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição do plasma seminal (PS) na descongelação do sêmen ovino criopreservado em pellets na inseminação artificial (IA) via transcervical, em ovelhas com estro sincronizado. Utilizou-se 161 ovelhas da raça Ideal ginecologicamente sadias e com condição corporal acima de 3 (1-5). Para sincronização do estro utilizou-se pessários vaginais impregnados com 50mg MAP, por 12 dias. Na retirada dos mesmos, foram aplicados 250UI de eCG (Novormon) IM. O sêmen foi obtido de cinco carneiros da raça Ideal, criopreservado em pellets. Uma amostra de cada partida foi submetida ao teste de termoresistência (37°C/6 horas), descongelada em meio PS ovino e também em meio com solução salina fosfatada (PBS) para avaliação da motilidade e integridade do acrossoma por um período de 6 horas de incubação. Somente foram aprovadas partidas que apresentaram ao final do TTR 25% de motilidade e 20% de células integras vivas no final da incubação. O PS foi obtido de dois carneiros vasectomizados e preservados a -20°C. No momento da IA, o PS ou PBS foi utilizado como meio de descongelação do pellet em banho Maria a 37 °C, na proporção de 1:1 (sêmen/PS ou PBS). As IA foram realizadas em tempo fixo a partir das 50 horas após a retirada dos pessários vaginais, pelo método transcervical sem tração. Conforme o grau de penetração do aplicador de sêmen no canal cervical das ovelhas considerou-se três graus de profundidade caracterizados como: grau 1: superficial; grau 2: intermediário; grau 3: profundo. Foram inseminadas 50 ovelhas com sêmen congelado/descongelado com PS, 50 ovelhas inseminadas com sêmen congelado/descongelado com PBS e como grupo controle 61 ovelhas com sêmen fresco/diluído com PBS. Após 45 dias da IA, foi realizado o diagnóstico de prenhez, por ultra-sonografia. As ovelhas inseminadas apresentaram os percentuais de prenhez de 60,0% (50/30), 74,0% (50/38) e 67,2% (61/41), respectivamente, para sêmen congelado/descongelado, sem plasma seminal, com plasma seminal e fresco/diluído respectivamente. Quanto à penetração cervical obteve-se os percentuais de prenhez de 52,3%, 66,6% e 83,3% , respectivamente, para os graus 1, 2 e 3. Os índices de prenhez não diferiram entre os tratamentos (PBS/PS/FRESCO) nos graus 1 e 2. No entanto, as percentagens de prenhez diagnosticadas nas ovelhas inseminadas com sêmen fresco (95,6%) e com

sêmen congelado com PS (94,1%) foram superiores as obtidas com sêmen congelado com PBS (60,0%;  $P < 0,05$ ) no grau de penetração 3. Tendo como base os resultados obtidos, conclui-se que, o sêmen congelado utilizado via cervical, adicionado de plasma seminal obteve índices de gestação satisfatórios no mesmo patamar que o sêmen fresco.

**Palavras chaves:** sêmen congelado-descongelado, plasma seminal, reação do acrossoma, inseminação artificial.

## **USE OF SEMINAL PLASMA ON FROZEN-THAWED RAM SEMEN TO TRANSCERVICAL ARTIFICIAL INSEMINATION IN EWES WITH SYNCHRONIZED ESTRUS**

### **ABSTRACT**

The aim of the present experiment was to evaluate the effect of the seminal plasma for thawing ram semen criopreserved in pellets on trans-cervical artificial insemination (AI) in sheep with synchronized estrus. Ewes ( $n=161$ ), Polwarth bred, gynecological health, with body condition above 3 (1-5). The ewes had their estrus synchronized with a vaginal device containing 50mg of medroxyprogesterone acetate (MPA) by 12 days. The animals were injected IM with 250UI of eCG (Novormon) when the MPA was removed. The semen was obtained from five Polwarth ram criopreserved in pellets. A sample of each batch was submitted to thermo-resistance test (TRT; 37°C/6 hours) thawed with and without ram seminal plasma and the motility and acrosome integrity was evaluated at 6 hours of incubation period. Semen samples were used when they were with a motility of at least 25% in TRT and 20% of live cells and acrosome integrity after 6 h. The plasma seminal was taken from two vasectomized ram, centrifuged and storage at -20°C. At the moment of artificial insemination the semen was resuspended with thawed plasma seminal or with PBS (1:1) The AI was in fixed time, at 50 hours after removing the vaginal device, by the method trans-cervical without traction. The penetration degree of the semen applicator in the ewe cervical channel was classified as following: degree 1: superficial; degree 2: intermediate; degree 3: deep. Fifteen ewes was inseminated with frozen-thawed semen with seminal plasma, fifteen ewes was inseminated with



frozen-thawed semen with PBS and in control group 61 ewes were inseminated with fresh semen diluted with PBS. The diagnosis of pregnancy was performed 45 days after AI with ultrasound. The pregnancy rate was 60.0% (50/30), 74.0% (50/37) and 67.2% (61/41), respectively for frozen semen and thawed without seminal plasma, with seminal plasma and fresh semen. In according to cervical penetration, the percentage of pregnancy was 52.3% (Degree 1), 66.6% (Degree 2) and 83.3% (Degree 3). The pregnancy rate did not differ among treatments in degrees 1 and 2. However, the pregnancy in ewes inseminated with fresh semen (95.6%) and with frozen-thawed semen with seminal plasma (94.1%) were higher than with frozen-thawed semen without plasma (60.0%;  $P < 0.05$ ) in degree 3. Based on results, the conclusion is, frozen semen additioned of seminal plasma used at cervical way had satisfactory pregnancy rates similar that fresh semen.

**Key words:** frozen-thawed semen, plasma seminal, acrossome reaction, artificial insemination.

## INTRODUÇÃO

A técnica de IA é a ferramenta mais apropriada para o incremento e rápida multiplicação de indivíduos portadores de genes superiores permitindo benefícios sobre a produtividade do rebanho. Em ovinos, o maior obstáculo para o incremento e consolidação da IA, é a sua baixa taxa de prenhez, quando se utiliza sêmen congelado pela via cervical, cujos ganhos ainda não proporcionam resultados de prenhez consistentes e comercialmente aceitáveis.

Dentre as causas desta situação atribui-se a dificuldade de se atingir o lúmen uterino, através da via cervical, por apresentar anéis excêntricos, (Halbert et al., 1990), inabilidade dos espermatozóides criopreservados em atravessar a cervix (Windsor, 1995), mas principalmente pelas alterações bioquímicas, moleculares e da estrutura lipídica (Holt, 2000) das células espermáticas pelo aumento precoce do número de espermatozóides capacitados e acrossomas reagidos precocemente após a congelação e descongelação (Evans e Maxwell, 1990, Salamon e Maxwell, 1995), assim elevando o custo do cordeiro nascido.

O método da laparoscopia em ovinos vem permitindo a utilização de sêmen congelado, proporcionando índices de prenhez semelhantes aos obtidos com a monta natural, no entanto exige uma série de equipamentos e instrumentais de elevado custo e pessoal especializado (Souza, 1993). Já a IA com sêmen congelado via cervical proporcionaria uma aplicação mais ampla por produtores em um maior número de animais tornando a técnica mais simples (Halbert et al., 1990), como ocorre em bovinos.

Em busca de alternativas para aumentar a viabilidade espermática do sêmen congelado de ovinos, pela IA via cervical, estudos vêm sendo desenvolvidos com a utilização de PS. Como realizado por Ollero et al. (1997), os quais demonstraram que o PS melhora a viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do sêmen de carneiro criopreservado.

Em bovinos, Henault & Killian (1996) notaram aumento na taxa de penetração de ovócitos por espermatozóides de animais de baixa fertilidade devido à adição de PS de animais de alta fertilidade. Aurich et al. (1996) demonstraram que a adição de PS de garanhões de alta fertilidade em espermatozóides de animais de baixa fertilidade elevou a resistência dos espermatozóides ao congelação e

descongelamento. Maxwell et al (1999), utilizando a ressuspensão de 20 a 30% de PS diluído em PBS em sêmen descongelado de carneiro após a centrifugação, obtiveram um incremento dos índices de prenhez mediante sua aplicação por via cervical superficial.

Lausmann et al. (2002), trabalhando com três protocolos de congelamento, caracterizados pela utilização ou não da centrifugação e verificando a ação do plasma seminal adicionado com várias concentrações sobre o estado de capacitação espermática, quando adicionado ao sêmen ovino descongelado, observaram que concentrações acima de 75% de PS permitem a efetiva proteção dos espermatozoides. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição do PS na descongelamento de sêmen ovino após IA cervical em ovelhas com estro sincronizado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado na Fazenda Experimental Sucupira, Brasília – DF, junto ao o laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BIOREP da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria - RS e as inseminações artificiais foram realizadas na estação reprodutiva na Fazenda Boa Fé, localizada no município de São Gabriel – RS.

### **Coleta e avaliação de sêmen**

O sêmen foi coletado de cinco carneiros da raça Ideal com idade de 2 a 4 anos previamente submetidos a uma avaliação andrológica e em bom estado nutricional. O sêmen foi coletado com vagina artificial e logo após foi avaliado quanto ao volume, motilidade, vigor e concentração espermática. Os parâmetros mínimos utilizados para a criopreservação do sêmen foram: (volume > 0,75 ml; motilidade > 70%; vigor > 3; total de morfologia espermática < 20%; e concentração mínima de  $3 \times 10^9$  por ml).

## **Criopreservação**

Após a coleta, o sêmen foi diluído na proporção de 1:2 (sêmen/meio) em um meio a base de tris-gema (Evans e Maxwell, 1990), e mantidos em um banho-maria a +32 °C até a avaliação do exame imediato. Foi, então, resfriado e estabilizado em um refrigerador a +5 °C por 120 minutos. No fim do período de estabilização o sêmen foi congelado em *pellets* em um volume de 130 µl, sobre uma bandeja com gelo seco a uma temperatura de - 79°C por um período de 6 minutos e depositados em tubos plásticos devidamente identificados, em nitrogênio líquido e transferidos para um botijão de nitrogênio.

## **Coleta do plasma seminal**

O PS foi coletado uma vez por semana pelo método de eletroejaculação. Após sua coleta foi centrifugado (600g/10 minutos) e o sobrenadante acondicionado em tubos eppendorf de 1,5 ml e congelados à - 20 °C.

## **Avaliação do sêmen congelado**

Para a avaliação das amostras congeladas, o sêmen foi descongelado em banho-maria a +37 °C, e incubados por 6 horas, em PS e PBS numa proporção de 1:1 (sêmen congelado/descongelado com PBS ou PS). Uma amostra também foi retirada para avaliação da concentração do pellet. Visando determinar o estado da reação acrossômica e da motilidade, foram coletadas amostras na hora 0 e 6, após a descongelação, e coradas pela técnica Trypan Blue e Giemsa descrita por Didion et al. (1989). Para cada amostra foram contadas 200 células por lâmina, os espermatozóides encontrados foram classificados conforme a seguinte descrição:

- espermatozóides mortos com acrossoma intacto (MI) – cabeça azul escuro com acrossoma rosado;
- espermatozóides mortos com acrossoma reagido (MR) – cabeça azul escuro com o acrossoma descorado (ausente).
- espermatozóides vivos com acrossoma intacto (VI) – cabeça branca ou roxa clara com acrossoma rosado.

- espermatozóides vivos com acrossoma reagido (VR) – cabeça branca ou roxa clara com acrossoma descartado (ausente).

### **Sincronização estral das ovelhas**

Para sincronização do estro utilizou-se pessários vaginais impregnados com 50mg MAP (BIOREP) por 12 dias em ovelhas previamente avaliadas ginecologicamente e condição corporal acima de três. . Na retirada dos mesmos foram aplicados 250UI de eCG (Novormon®) IM.

### **Método de inseminação artificial**

As IA foram realizadas, pela via cervical, sem tração, em tempo fixo a partir das 50 horas após a retirada dos pessários vaginais, utilizando-se vaginoscópio com fonte de luz e aplicador de sêmen ovino para palhetas de 0,25 ml (IMV®). Para IA as ovelhas foram contidas com o posterior elevado e apoiadas sobre um cavalete. Foi então realizada a higienização da vulva e introdução do vaginoscópio previamente lubrificado com vaselina. Após a introdução do vaginoscópio, e visualização da cérvix introduziu-se o aplicador de sêmen com a maior profundidade possível sem tração cervical, ocasião em que foi avaliado o grau de penetração do aplicador no canal cervical das ovelhas considerando-se três graus: grau 1: superficial; grau 2: intermediário; grau 3: profundo.

Utilizaram-se os seguintes tratamentos:

T1 – sêmen fresco;

T2 – sêmen congelado/descongelado com PS;

T3 – sêmen congelado/descongelado com PBS.

### **Diagnóstico de prenhez**

Aos 45 dias pós IA, foi realizado diagnóstico de prenhez, por ultra-sonografia, utilizando-se um transdutor de 5 MHz, pela via trans-abdominal, confirmando-se estes resultados após o parto.

## **DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

As partidas congeladas e liberadas para a IA foram somente aquelas que apresentaram um pellet com concentração mínima de  $150 \times 10^6$  ao final do TTR 25% de motilidade espermática e 20% de células íntegras vivas após as 6 horas de incubação com PS e PBS.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados considerando o Delineamento em Parcelas Subdivididas (Sampaio, 1998). No delineamento utilizou-se cinco indivíduos, 16 partidas que foram submetidos a dois tratamentos, observados em quatro diferentes tempos. A análise estatística dos dados foi realizada através de uma Análise de Variância, utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (SAS, 2003). Para o teste múltiplo entre as médias adotou-se o teste t, ao nível de significância de 5%. No estudo das interações significativas adotou-se a opção LSMEANS (Teste pdiff). As interações de interesse foram representadas por tabelas e visualizadas por meio de gráficos usando planilhas do Excel. As variáveis binomiais, taxa de prenhez e grau de penetração, foram realizadas pelo teste Qui-Quadrado.

## **RESULTADOS**

As partidas utilizadas para a IA foram aprovadas segundo os seguintes critérios mínimos: 25% de motilidade e 20% de espermatozóides vivos com acrossoma íntegro (VI) após 6 horas de incubação conforme demonstrado na tabela 2.1. Das dezesseis partidas obtidas quatro foram aprovadas. Para a análise estatística a motilidade e integridade do acrossoma foram consideradas todas as partidas congeladas. O teste estatístico mostrou que o tratamento com PS proporcionou porcentagem superior ( $P < 0,05$ ) para os parâmetros de espermatozóides VI ( $21,7 \pm 11,6$  vs  $14,6 \pm 0,9$ ) e MI ( $65,2 \pm 0,8$  vs  $45,3 \pm 11,2$ ) em relação ao tratamento com PBS no final da incubação conforme demonstrado na tabela 2.2. Quando observado os parâmetros de motilidade ( $23,2 \pm 0,9$  vs  $20,8 \pm 0,8$ ) e espermatozóides VR ( $12,4 \pm 0,6$  vs  $5,0 \pm 0,9$ ) e MR ( $27,9 \pm 0,8$  vs  $9,0 \pm 0,5$ ) no final da incubação o PBS mostrou-se superior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento com PS na tabela 2.3.

Quando analisado só as partidas selecionadas para a IA cervical observou-se uma equivalência para o parâmetro motilidade entre os tratamentos PBS e PS, e

quando comparado o parâmetro de espermatozóides VI o tratamento com PS se mostrou superior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento PBS. Essas avaliações se mostraram bem superior a media de todas as partidas.

Quando analisado a passagem do aplicador de IA pela cérvix, neste trabalho, observou-se que o grau 1 e 3 foram mais freqüentes, seguidos do grau 2 de penetração da cérvix (Tabela 2.4). Quando comparado a taxa de prenhez com o grau de penetração, o grau 3 apresentou melhores taxas de prenhez ( $P < 0,05$ ) que o grau 2 e 1.

A taxa de prenhez na IA cervical com os tratamentos de sêmen utilizados encontra-se na tabela 2.5. Os dados para passagem cervical mostraram que os graus 1 e 3 de penetração foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao grau 2. Quanto a taxa de gestação o grau 3 mostrou melhores resultados de prenhez ( $P < 0,05$ ), inclusive mais elevadas que os graus 1 e 2, respectivamente. Os dados mostraram uma taxa de prenhez maior ( $P < 0,05$ ) utilizando o sêmen descongelado com PS e fresco com grau 3 de penetração quando comparados com o tratamento com PBS.

## **DISCUSSÃO**

A fertilidade está diretamente relacionada com a qualidade do sêmen, sendo de fundamental importância a utilização de análises precisas de cada partida de sêmen, trazendo maiores chances de sucesso na IA. Diversos testes são utilizados para determinar a qualidade do sêmen. Mas em ovinos, a congelabilidade, sofre marcante variações entre indivíduos e entre ejaculados (Gillan et al., 2004; Peris et al., 2004). Entre as principais crioinjúrias causadas nos espermatozóides destacam-se às lesões na membrana plasmática e acrossomática, a redução da motilidade e viabilidade (Valcárcel et al., 1997). Um dado relevante é que o processo de refrigeração, congelamento e descongelamento do sêmen dos carneiros interferem na maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozóides capacitados ou com acrossoma reagido, prematuramente, em comparação ao sêmen fresco (Maxwell e Watson 1996). Alguns estudos já realizados têm demonstrado que o PS melhora a viabilidade espermática, evitando a capacitação e reação precoce do sêmen ovino criopreservado em pellets quando adicionado na descongelamento (Maxwell et al., 1999; Lausmann et al., 2002; Silva et al., 2005).

Foram selecionadas as partidas estabelecidas através de critérios pré-determinados para a utilização na IA. Foram coletadas dezesseis partidas de cinco carneiros, das quais apenas quatro foram aprovadas, de dois carneiros. Um dos reprodutores teve duas partidas congeladas e aprovadas integralmente e um outro teve seis partidas congeladas e apenas duas aprovadas. Os outros três carneiros não tiveram nenhuma partida aprovada. Essas diferenças entre indivíduos e ejaculados observadas neste trabalho podem estar relacionadas à sensibilidade a criopreservação do sêmen de alguns machos e também variabilidade entre ejaculados conforme relataram Yanagimachi, (1994); Peris et al., (2004).

Watson (1995) relatou que diferenças tanto na frequência de ejaculação como nos períodos de trânsito e na mistura de espermatozóides no epidídimo proporcionam um mecanismo potencial para a variabilidade, explicando a razão dos ejaculados nos indivíduos poderem ter comportamento variável frente ao processo de criopreservação. Essa variabilidade funcional na resposta de espermatozóides tratados pelo mesmo método faz parte de um fenômeno mais amplo de heterogenia. Um problema de importância prática na indústria de preservação de sêmen são os reprodutores denominados bons congeladores e maus congeladores. Independente da qualidade anterior, o sêmen de certos indivíduos é congelado com menos crioinjúrias em relação a outros (Watson, 1995).

Avaliado a média de todas as partidas no parâmetro de motilidade no final da incubação o tratamento com PBS se mostrou superior ao PS Esses dados não corroboram com os resultados encontrados por Maxwell (1999) e Silva et al. (2005). Diferenças entre resultados de motilidade obtidos por outros autores e aqueles encontrados neste trabalho, podem ter sido causadas por vários fatores entre eles, as diferenças entre raças e indivíduos e as diferenças entre meios e componentes usados para a criopreservação, incubação e a avaliação do sêmen. O procedimento de diluição do sêmen ovino, antes da avaliação, se torna necessário para sêmen *in natura* ou sêmen congelado pela sua alta concentração e dificuldade de avaliação. Para Windsor (1997), a motilidade pós-descongelação, acessada subjetivamente ou objetivamente, não é necessariamente um bom indicador da função metabólica do sêmen sendo um pobre indicador para a capacidade fecundante. Eppleston & Maxwell (1993) por sua vez relataram não haver nenhuma correlação entre os parâmetros como motilidade, velocidade e linearidade mensuradas pelo CASA no



sêmen congelado de 97 carneiros e a fertilidade obtida por inseminação por laparoscopia de mais de 5000 ovelhas relatando não haver relação entre motilidade pós-descongelação e índice de fertilidade. Câmara et al. (2004) relatam que, após selecionar os reprodutores pelo parâmetro de motilidade após a descongelação e classificados como de alta, média e baixa congelabilidade apresentando 80%, 70% e 53% de suas amostras aprovadas respectivamente, que apesar da variabilidade dos grupos de congelabilidade de seus ejaculados, a taxa de gestação não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os grupos de ovelhas submetidas a IA por laparoscopia, com sêmen proveniente de carneiros com alta (10,71%), média (32,00%) e baixa (14,81%) congelabilidade, demonstrando que as amostras aprovadas após a descongelação não influenciam nos índices de fertilidade. Neste trabalho, as partidas aprovadas para a IA cervical não tiveram diferença entre os tratamentos de PBS e PS e apresentaram seus parâmetros mais elevados que a média de todas as partidas.

Em relação à avaliação da integridade de acrossoma, para todas as partidas, o parâmetro de células vivas com acrossoma íntegro foi superior no tratamento com PS no final da incubação, mostrando que o plasma seminal foi efetivo modulando a integridade do acrossoma, evitando assim uma reação de acrossoma precoce. Maxwell et al. (1999) relataram que espermatozoides de ovinos congelados-descongelados e ressuspensos em uma solução de 20% de plasma seminal em PBS não exibiram uma menor capacitação avaliada pela clortetraciclina (CTC) que aqueles ressuspensos somente por PBS, e o grupo com plasma seminal levou a uma maior taxa de prenhez após a IA cervical. Lausmann et al. (2002) e Silva et al (2005) observaram que o plasma seminal ovino adicionado ao sêmen após a descongelação exerceu efeito protetor sobre os espermatozoides prevenindo a reação de acrossoma precoce.

Quando analisado a passagem do aplicador de IA pela cérvix, neste trabalho, observou-se que o grau 1 e 3 foram mais freqüentes, seguidos do grau 2 de penetração da cérvix com (39%, 37,2% e 23,6%, respectivamente). Quando comparado a taxa de prenhez com o grau de penetração, o grau 3 apresentou melhores taxas de prenhez ( $P<0,05$ ) que o grau 2 e 1 (83,9%, 65,8% e 53,9% para grau 3, 2 e 1, respectivamente). Uma explicação para esse fato é que quando o sêmen congelado-descongelado é depositado mais próximo do local de fertilização, há uma perspectiva maior de fertilização. Silva et al. (2005) realizando IA cervical,

com tração e exteriorização do colo obtiveram, com sêmen fresco diluído com leite desnatado UHT, um resultado de transposição da cérvix de 81 ovelhas de 1,2%, 13,6%, 14,8% e 70,4%, respectivamente, para cervical superficial, cervical intermediária, cervical profunda e intra-uterina com uma porcentagem de prenhez de 0%, 36,4%, 50,0% e 66,7%, respectivamente, para cervical superficial, cervical intermediária, cervical profunda e intra-uterina, quando comparado o número de ovelhas gestantes sobre o número de ovelhas inseminadas nos graus de penetração, para a taxa de fertilidade. Souza (1993) utilizando duas técnicas de IA cervical sem tração da cérvix e com tração da cérvix e uma intra-uterina, por laparoscopia obteve resultados de 28,9%, 45% e 57,1% de prenhez, respectivamente, aos tratamentos mencionados, mostrando que a IA intra-uterina proporcionou resultados satisfatórios e que a IA cervical com tração tornou uma técnica viável, mas ressaltando os cuidados que se deve ter com este tipo de procedimento. Perez et al. (1996) relatam que mudanças severas na estrutura e função dos espermatozóides ovinos submetidos ao processo de criopreservação foi responsabilizada pela baixa capacidade de fertilização e taxas reduzidas de concepção após a IA cervical. Esse índice obtido neste experimento pode estar relacionado a diversos fatores dos quais se destaca às condições reprodutivas das ovelhas, pois eram ovelhas que apresentaram entre uma a duas partições em sua vida reprodutiva antes da IA cervical. Windsor (1995) verificou também, que a taxa de penetração cervical aumentava quanto maior o número de partos de uma ovelha (21,1; 41,2 e 43,4% para ovelhas com 1, 2 e 3 partos, respectivamente). Este fato era esperado em vista da dilatação cervical que ocorre em cada partição.

Alguns pesquisadores têm relatado que na IA via cervical, com sêmen congelado, os índices médios obtidos ficam em torno de 10 a 35% de fertilidade (Neves et al., 1983; Souza, 1993; Windsor, 1997; Naqvi et al., 1998; Anel et al., 2005) cifras distantes daquelas obtidas com a IA por laparoscopia com sêmen congelado com índices médios obtidos de 50 a 70% de fertilidade (Luz, 1991; Maxwell et al. 1995; Anel et al., 2005). A IA via cervical apresenta entraves críticos como a complexa anatomia da cérvix da ovelha apresentando pregas cartilaginosas dispostas em diferentes planos e direções, dificultando a deposição do sêmen no lúmen uterino e um dos maiores fatores limitantes é a utilização de sêmen congelado, obtendo uma fertilidade baixa depois da IA cervical estando relacionado a inabilidade do espermatozóide em atravessar a cérvix após ser submetido a

congelamento e descongelamento (Windsor, 1995) levando assim uma pequena população de espermatozoides viáveis ao local de fertilização (Evans & Maxwell, 1990).

Com os resultados apresentados *in vitro* nesse trabalho a adição do PS exerceu um efeito protetor aos espermatozoides contra a reação de acrossoma precoce. Buscou-se avaliar essa ação agora *in vivo* na IA cervical utilizando o PS na descongelamento. Corroborando com os resultados apresentados *in vitro* por Lausmann et al. (2002) e Silva et al (2005) e *in vitro e in vivo* por Maxwell et al. (1999) o tratamento com PS evidenciou benefícios, mostrando índices de prenhez nesse trabalho em todos os graus de penetração 1, 2 e 3, superiores ao tratamento com PBS (65,1%, 71,4% e 94,1% vs 53,8%, 64,7% e 60,0%). Quando avaliado no grau 3 três de penetração observou-se um resultado semelhante ao sêmen fresco e significativamente superior ao tratamento com PBS. O'Meara et al. (2007) relatam que não obtiveram melhora na taxa de prenhez após a ressuspensão do plasma seminal na descongelamento devido a diferentes preparações espermáticas e procedimentos de seleção e variações entre indivíduos, e em suas características dependendo de fatores do ambiente como estação do ano, variação nas coletas, temperatura, nutrição e estresse. Maxwell et al. (1999) avaliando a penetração do sêmen congelado-descongelado no muco cervical em presença ou ausência de PS demonstraram que na presença de PS ocorre aumento da habilidade do sêmen congelado-descongelado de penetrar o muco cervical em maior número e distância percorrida. Mortimer et al. (2004) sugerem que fatores presentes no PS seriam responsáveis por esse incremento na proteção a reação de acrossoma precoce.

Os resultados indicaram que foi satisfatório o índice de fertilidade na IA cervical com sêmen congelado-descongelado podendo estar relacionado com a utilização de sêmen qualificado. Destacando principalmente a atribuição empregada do PS acreditando melhorar o transporte espermático através do trato genital feminino conseguindo assim levar uma população maior de espermatozoides viáveis ao local de fertilização e realizando um efeito protetor aos espermatozoides congelados-descongelados contra a reação de acrossoma precoce. Novos estudos em outros rebanhos e raças devem ser realizados *in vitro e in vivo* para uma certificação ou não destes resultados e conseqüentemente consolidação destas técnicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEL, .L. KAABI, B. ABROUG, M. ALVAREZ, E. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a fiel assay. **Theriogenology**. v. 63 p.1235-1247, 2005.

AURICH, J. E.; HOPPE, H.; Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v.46, p.791-797, 1996.

CÂMARA, D. R.; SIMPLICIO, K .M. M. G.; GUERRA, M. M. P.; BRANDÃO, E. W. P.; PADILHA, R. T. Inseminação laparoscópica em tempo fixo utilizando sêmen congelado proveniente de carneiro com diferentes níveis de congelabilidade. **Tese (mestrado)**. Universidade Rural de Pernambuco, p. 52 2004.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J R.R; GRAVES,C.N., Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamet Res.**, 22 (1), 51-57, 1989.

EPPLESTON, J., MAXWELL, W. M. C. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix. **Wool Tech. Sheep Breed.** Kensington, v.41, p.291-302, 1993.

EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza : Acribia, 1990. 191p.

GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and avaliation of sêmen for artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v.16 p.447-454, 2004.

HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., SHARPE, P., BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.

HENault, M. A.; KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Jornoul Reproduction Fertility**. v.108, p.199-204, 1996.

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

LAUSMANN, C. V. Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. **(Dissertação Mestrado)**, Universidade Federal de Santa Maria, p.57. 2002.

Luz , S. L. N. Inseminação artificial por laparoscopia em ovinos. **Tese (Mestrado)** Universidade de Santa Maria. 1991

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.; EVANS, G.; MORTIMER, S. T.; GILLAN, L.; GELLATLY, E.E.; McPHIE, C. A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v. 11, p. 123-126, 1999.

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

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; BAG, S.; MITTAL, J.P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**. v. 29, p.329-333, 1998.

NEVES, J. P.; BLAYA, M. C. R.; TEXEIRA, P. R. Efeito da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. **A hora Veterinária**, Porto Alegre. V.3 n.14, p.11-14, 1983.

OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reprod. Fertil. Dev.**, Zaragoza, v.9, p. 381-390, 1997.

O'MEARA, C. M.; DONOVAN, J. P. 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.

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE,H., Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay, **Theriogenology**, 46: 131-140, 1996.

PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**. v.25, n.2, 2004.

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal, Belo Horizonte:**Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 1998.

SAS Statistical Analysis System, User"Guide, Caru Indiana, 1999, 295p.

SILVA, T.A.S.N., NEVES, J.P., NETO, A.G.G., GUIMARÃES, A.P., RUMPF, R., SARTORI, R. Viabilidade e estado acrossomal do sêmen ovino descongelado e incubado com plasma seminal. **Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – XVI CBRA** Goiânia, 2005.

SILVA, J. C.B.; OLIVEIRA, R.; TRALDI, A. S. Inseminação artificial intra-uterina em ovinos por via trans-cervical. **Acta Scientie Veterinarie** v.33 suplemento 1 p.307, 2005.

SOUZA, M.I.L. A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado. **(Dissertação de Mestrado)** – Universidade Federal de Santa Maria, 47p, 1993.

VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARE, H. Assessment of acrossomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45 p. 299-309, 1997.  
Watson et al., 1991

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**. v.7, p.871-891, 1995.

WINDSOR, D.P.; WHITE,I.G., Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage, **Animal Reproduction Science**, 40, 43-58, 1995.

WINDSOR, D. P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reproduction Fertility and Development**. v.9, 279-284, 1997.

YANAGIMACHI, R., Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. **The Physiology of Reproduction** New York: Raven Press, 1994.

Tabela 2.1. Informações espermáticas das partidas selecionadas para a IA. Dados da motilidade (%), espermatozóides vivos íntegros (VI) (%), espermatozóides vivos reagidos (VR) (%), espermatozóides mortos íntegros (MI) (%) e espermatozóides mortos reagidos (MR) (%) no sêmen ovino na descongelação aprovados pelo ranking a 0h e 6h de incubação com tratamento com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e plasma seminal (PS).

Partida	Carneiro	Trat	Tempo de incubação (h)									
			Mot(%) 0h	Mot(%) 6h	VI(%) 0h	VI(%) 6h	MI(%) 0h	MI(%) 6h	VR(%) 0h	VR(%) 6h	MR(%) 0h	MR(%) 6h
4	343	PBS	60	30	57	22	30	37	3	19	10	22
4	343	PS	50	35	46	32	40	63	1	1	13	3
6	343	PBS	50	35	48	21	43	36	3	16	6	27
6	343	PS	50	30	48	28	32	57	6	2	14	13
1	2005	PBS	50	35	47	23	37	27	1	15	15	35
1	2005	PS	50	35	50	33	37	61	3	2	10	3
2	2005	PBS	60	30	58	21	32	41	2	17	8	21
2	2005	PS	50	35	52	36	29	56	5	3	14	4

Tabela 2.2. Médias ( $\pm$  desvio-padrão) da motilidade (%) no sêmen ovino na descongelação a 0h, 2h, 4h e 6h de incubação com tratamento com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e plasma seminal (PS).

Parâmetro	Tratamento	Período de Incubação (h)			
		0h	2h	4h	6h
Motilidade	PBS	52 $\pm$ 0,8	42 $\pm$ 11,3	36 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	23 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>
	PS	49 $\pm$ 10,4	41 $\pm$ 0,8	29 $\pm$ 13,7 <sup>B</sup>	20 $\pm$ 0,8 <sup>B</sup>

<sup>A, B</sup>, diferentes, na mesma coluna, diferem ( $P < 0,05$ , ANOVA, teste t).



Tabela 2.3. Médias ( $\pm$  desvio-padrão) espermatozoides vivos íntegros (VI) (%), espermatozoides vivos reagidos (VR) (%), espermatozoides mortos íntegros (MI) (%) e espermatozoides mortos reagidos (MR) (%) no sêmen ovino na descongelação a 0h e 6h de incubação com tratamento com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e plasma seminal (PS).

Tempo de incubação (h)	Tratamento	
	PS	PBS
VI (%) 0h	46,9 $\pm$ 0,9	48,0 $\pm$ 0,8
VI (%) 6h	21,5 $\pm$ 11,6 <sup>A</sup>	14,1 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>
MI (%) 0h	39,2 $\pm$ 0,7	36,0 $\pm$ 10,3
MI (%) 6h	65,1 $\pm$ 0,8 <sup>A</sup>	45,7 $\pm$ 11,2 <sup>B</sup>
VR (%) 0h	5,0 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,2
VR (%) 6h	5,0 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	12,6 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>
MR (%) 0h	10,3 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,4
MR (%) 6h	9,0 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>	27,3 $\pm$ 0,8 <sup>B</sup>

<sup>A, B</sup>, diferentes, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ , ANOVA, teste t).

Tabela 2.4. Média do grau de penetração pela cérvix em relação ao total de ovelhas inseminadas e taxa de prenhez correspondente ao grau de penetração da cérvix em ovelhas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Grau 1 Superficial (%)</b>	<b>Grau 2 Intermediária (%)</b>	<b>Grau 3 Profunda (%)</b>
Passagem pela cérvix	39,1 (63/161) <sup>a</sup>	23,6 (38/161) <sup>b</sup>	37,2 (60/161) <sup>a</sup>
Taxa de Prenhez	53,9 (34/63) <sup>b</sup>	65,8 (25/38) <sup>b</sup>	83,3 (50/60) <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>, diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05, ANOVA, teste t).

Tabela 2.5. Média da taxa de gestação em ovelhas inseminadas com sêmen fresco, descongelado adicionado de plasma seminal (PS) e descongelado adicionado de solução salina fosfatada tamponada (PBS) na IA cervical e com três graus de penetração cervical.

	<b>Grau 1</b>	<b>Grau 2</b>	<b>Grau 3</b>
	<b>Superficial (%)</b>	<b>Intermediária (%)</b>	<b>Profunda (%)</b>
Fresco	41,7 (10/24) <sup>c</sup>	64,3 (9/14) <sup>b</sup>	95,6 (22/23) <sup>aA</sup>
Descongelado + PS	65,1 (17/26)	71,4 (5/7)	94,1 (16/17) <sup>A</sup>
Descongelado + PBS	53,8 (7/13)	64,7 (11/17)	60,0 (12/20) <sup>B</sup>

<sup>A, B,</sup> diferentes, na mesma coluna, diferem ( $P < 0,05$ , ANOVA, teste t).

<sup>a, b,</sup> diferentes, na mesma linha, diferem ( $P < 0,05$ , ANOVA, teste t).