

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EMPREGO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO E CAPACITADO *IN VITRO*
NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL SUPERFICIAL EM
OVINOS.**

CARLOS ALBERTO BRIGONI E SILVA

PORTO ALEGRE

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EMPREGO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO E CAPACITADO *IN VITRO*
NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL SUPERFICIAL EM
OVINOS.**

Autor: Carlos Alberto Brigoni e Silva
Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias na
área de Reprodução Animal
Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE

2012

CARLOS ALBERTO BRIGONI E SILVA

**EMPREGO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO E CAPACITADO *IN VITRO*
NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL SUPERFICIAL EM
OVINOS.**

Aprovada em:

APROVADA POR:

Prof.Dr. José Luiz Rigo Rodrigues
Orientador e Presidente da Comissão

APROVADA POR:

Prof.Dr. Alberto Lopes Gusmão
Membro da Comissão

APROVADA POR:

Prof.Dr. Jairo Pereira Neves
Membro da Comissão

APROVADA POR:

Prof.Dr. Sony Dimas Bicudo
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, pois com sua luz e força permitiu que eu alcançasse muitas conquistas e ensinamentos na vida.

Aos meus pais, João Alberto Rebello e Silva e Beatriz Regina Brigoni e Silva, e ao meu irmão Leandro Brigoni e Silva, pelo apoio e incentivo que me deram durante esta jornada.

A Maria Luiza Soares Landell de Moura minha noiva, que com seu amor, carinho e paciência durante os momentos difíceis, sempre teve uma palavra de incentivo, acreditando na realização deste sonho.

Ao professor José Luiz Rigo Rodrigues, por ter aberto as portas do seu laboratório, pelos ensinamentos e a confiança depositada na minha pessoa.

Aos colegas estagiários, bolsistas e de Pós-Graduação do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução: Lis dos Santos Marques, Rafael Navarro, Natália Arruda Schmidt, Otávio Pires Sicco, Lauro Bertholdo, Carlos Brum Dias da Costa, Andrea Gianotti Galupo, Eliana Lopes, João Alfredo Horn, que contribuíram com empenho e amizade, na realização deste trabalho.

Ao funcionário João Roberto Lopes de Moraes, pela amizade e auxílio na realização do trabalho.

Ao professor Marcelo Bertolini, ao Cristiano Feltrin, e toda a equipe do laboratório de Biotecnologia Animal da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), que auxiliaram na realização do projeto.

Ao Márcio Aginsky, por ter cedido os carneiros para coleta de sêmen, pela experiência e conselhos, e a todos os funcionários da Cabanha Dedo Verde, que contribuíram na realização do projeto.

Ao Juliano Hoffelder, pela amizade e por ceder os animais para realização do experimento, e aos funcionários da Fazenda Figueira da Ilha, auxiliaram na realização do experimento.

Ao Pedro Silveiro que cedeu os animais, e a todos os funcionários da Fazenda Santa Luzia que contribuíram para a realização deste experimento.

Aos meus amigos que mesmo longe sempre estiveram comigo, me incentivando e dando força na realização deste projeto.

A CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização do Mestrado.

RESUMO

EMPREGO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO E CAPACITADO *IN VITRO* NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL SUPERFICIAL EM OVINOS.

A inseminação artificial intracervical superficial em ovinos é uma técnica simples, de baixo custo e eficiente no emprego do sêmen fresco. Por outro lado, particularidades do aparelho reprodutivo da fêmea ovina, a quantidade de células espermáticas que sobrevivem ao pós-congelamento bem como a capacitação precoce de espermatozóides durante o processo de criopreservação, impedem o emprego desta técnica com sêmen criopreservado, fazendo-se necessária a deposição intrauterina, com auxílio da laparoscopia. Desconhece-se a eficiência da inseminação artificial intracervical superficial em ovinos, empregando-se sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*. O experimento foi realizado com objetivo de determinar as taxas de prenhez com o sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: sêmen fresco (SF); sêmen congelado cervical (SCC); sêmen congelado laparoscopia (SCL); sêmen congelado capacitado cervical (SCCC); e sêmen congelado capacitado laparoscopia (SCCL). Todas as fêmeas receberam doses inseminantes com concentração de 200×10^6 sptz. As inseminações ocorreram em um período de 52 a 60 horas após a retirada dos dispositivos de progesterona. Os diagnósticos de prenhez foram realizados com auxílio da ultrassonografia 30 dias após as inseminações. As taxas de prenhez observadas foram: No grupo SF 42,30% (11/26), SCC 23,07% (6/26), SCL 54,16% (13/24), SCCC 25,92% (7/27), SCCL 48,14% (13/27), não existindo diferença estatística entre os grupos experimentais. O experimento realizado mostrou que é possível obter prenhez, empregando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação artificial pela via cervical em ovinos.

Palavras chaves: reprodução de ovinos, manipulação de sêmen, diagnóstico de gestação.

ABSTRACT

The superficial intracervical insemination in sheep is a simple, low cost and efficient technique using fresh semen. Still, the particularities of the female tract, the amount of sperm cells which survive and the early capacitation during the cryopreservation process, difficult the use of this technique with cryopreserved semen, making it's necessary to intrauterine with the aid of laparoscopy. It's unknown the efficiency of superficial intracervical insemination in ovine, using cryopreserved and in vitro capacitated semen. The experiment was carried out with the objective to determine the pregnancy rate of ewes inseminated with cryopreserved and in vitro capacitated semen. The females were randomly distributed among five experimental groups: fresh semen (SF), frozen semen cervical (SCC), frozen semen laparoscopy (SCL), frozen semen in vitro capacitated cervical (SCCC), frozen semen in vitro capacitated laparoscopy (SCCL). All females received dosis with 200×10^6 spz per insemination. The inseminations were performed from 52 to 60 hours after the withdrawal of progesterone implants. The pregnancy diagnosis was conducted by ultrasonography 30 days after inseminations. The observed pregnancy rates was: SF 42,30% (11/26), SCC 23,07% (6/26), SCL 54,16% (13/24) SCCC 25,92%, SCCL 48,14% (13/27). Our experiment showed that in sheep it's viable the superficial cervical artificial insemination using cryopreserved and in vitro capacitated semen.

Keywords: sheep reproduction, semen handling, pregnancy diagnosis.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Avaliação da capacitação espermática de amostras de sêmen submetidas a diferentes processamentos.....**42**
- Tabela 2. Determinação das taxas de prenhez aos 30 dias, nos grupos submetidos ou não a capacitação espermática pré-inseminação.....**42**

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ATP	adenosina tri-fosfato
MAP	acetato de medroxiprogesterona
BSA	albumina sérica bovina
cm	centímetro
CTC	clortetraciclina
CO ₂	dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfoxido
RNE	envelope nuclear redundante
SM	esfingomielina
Sptz	espermatozóides
FAO	food and agriculture organization
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PS	fosfatidilserina
PLC	fosfolipases específicas
Gal-T	galactosil - transferase
CFTR	gene de regulação da condução transmembrânica da fibrose cística
ANXA1	glicoproteína de ligação das microvilosidades do oviduto 1
ANXA2	glicoproteína de ligação das microvilosidades do oviduto 2
ANXA4	glicoproteína de ligação das microvilosidades do oviduto 4
ANXA5	glicoproteína de ligação das microvilosidades do oviduto 5
SBG	glicoproteína espermática de ligação
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
g	grama
°	graus
°C	graus Celsius
FSH	hormônio folículo estimulante
LH	hormônio luteinizante
HCO ₃ ⁻	íon bicarbonato
Cl ⁻	íon cloro
Ca ²⁺	íon cálcio
K ⁺	íon potássio

Na ⁺	ion sódio
IA	inseminação artificial
HDL	lipoproteína de alta densidade
LDL	lipoproteína de baixa densidade
Fert-TALP	meio de capacitação
MHz	megahertz
µg	micrograma
µL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitros
mm	milímetro
nm	nanômetro
mM	milimolar
mOM	miliosmol
N	número
BSP	plasma seminal bovino
PVP	polivinil-pirrolidona
%	porcento
PDC-109	proteína de ligação com a heparina
BSP30K	proteína de ligação da porção apical dos espermatozóides
BSPA3	proteína de ligação da porção apical dos espermatozóides
AQN1	proteína da família das espermadesinas
DQH	proteína receptora da heparina
q.s.p	quantidade suficiente para
RPM	rotações por minuto
SF	sêmen fresco
SCC	sêmen criopreservado via cervical
SCL	sêmen criopreservado via laparoscópica
SCCC	sêmen criopreservado capacitado <i>in vitro</i> via cervical
SCCL	sêmen criopreservado capacitado <i>in vitro</i> via laparoscópica
SRD	sem raça definida
TRIS	tri-hidroximetil-amino-etano
UI	unidade internacional
ZP	zona pelúcida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Capacitação espermática	14
2.1.1 Transporte espermático.....	14
2.1.2 Eventos bioquímicos da capacitação.....	17
2.2 Inseminação artificial em ovinos	23
2.2.1 Histórico.....	23
2.2.2 Inseminação cervical.....	24
2.2.3 Inseminação intrauterina.....	25
2.2.4 Diluentes e criopreservação.....	27
2.2.5 Métodos de indução e sincronização do estro.....	31
3 ARTIGO	
EMPREGO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO E CAPACITADO <i>IN VITRO</i> NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL SUPERFICIAL EM OVINOS	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
Local de realização do experimento.....	38
Animais.....	38
Reagentes.....	38
Coleta e criopreservação do sêmen.....	38
Sincronização do estro.....	39
Capacitação espermática <i>in vitro</i>	39
Inseminação artificial.....	39
Determinação da capacitação espermática.....	40
Diagnóstico de prenhez.....	41
Análise estatística.....	41
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÃO.....	47

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura tem procurado aumentar a sua participação no agronegócio brasileiro. O Brasil possui aproximadamente 17 milhões de ovinos, tendo a região sul uma participação significativa na composição deste rebanho. O Rio Grande do Sul é o maior estado produtor, com 23,5% (3.946.349) do rebanho nacional, vindo em segundo lugar à Bahia com 18% (3.028.507) (IBGE, 2009).

De acordo com relatório publicado pela FAO (2011), órgão das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, sobre o mercado internacional da carne ovina, os preços tendem a atingir recordes devido a uma série de fatores como: condições climáticas adversas, reconstrução de rebanhos, problemas sanitários e custo de insumos. Com uma limitação na disponibilidade de carne ovina pelos principais países exportadores (Austrália, Nova Zelândia e Estados Unidos), o mercado mundial de carne ovina teve em 2011, um crescimento de 13,1 milhões de toneladas. Essa oferta limitada pode estimular as vendas nos países da América do Sul.

Essas projeções mostram como o mercado da ovinocultura (carne e leite) em nosso país está aquecido, e tanto o criador quanto o consumidor são partes fundamentais deste processo. Há uma demanda por produtos com qualidade, e cabe ao criador investir não somente em genética, mas também em nutrição e sanidade, ofertando um produto que atenda as exigências do mercado consumidor.

O período reprodutivo das ovelhas é regulado pela época do ano, com maior atividade nos períodos de menor intensidade de luz solar. A utilização de métodos de indução e sincronização do estro permite que os animais realizem até três partos em dois anos, nas regiões afastadas do equador.

A inseminação artificial é uma ferramenta eficaz no auxílio aos programas de melhoramento genético, pois permite fecundar um número maior de fêmeas com um único ejaculado de um macho provado, disseminando e mantendo características desejáveis dentro de um mesmo rebanho, e eliminando o contato físico entre os animais, evitando a ocorrência de doenças sexualmente transmissíveis.

Em ovinos, os primeiros relatos da realização de um procedimento de inseminação artificial datam da primeira década do século XX. A partir dos anos 30, com o desenvolvimento da primeira vagina artificial para a espécie, é que a exploração da atividade tomou impulso (MIES FILHO, 1987).

No Rio Grande do Sul a partir da década de 40, foi fomentada a utilização da inseminação artificial em ovinos com sêmen fresco, o que culminou com expressivo percentual de ovelhas inseminadas no final da década de 70. Porém, a queda do preço da lã das últimas décadas levou a uma redução dos rebanhos existentes no Estado (MORAES, 2002).

O método de inseminação mais difundido em ovinos é a inseminação artificial intracervical superficial utilizando sêmen fresco, pois é uma técnica simples e econômica de ser implantada, apresentando resultados satisfatórios. A inseminação artificial utilizando sêmen ovino criopreservado apresenta melhores resultados quando realizada via intrauterina. Porém o alto custo de execução, pois exige instrumental apropriado e mão-de-obra qualificada, torna o emprego desta técnica pouco difundido (SANCHEZ-PARTIDA *et al.*, 1999; SALAMON e MAXWELL, 2000).

Atualmente, o desafio é identificar alternativas técnicas que permitam o emprego eficiente, e em larga escala, do sêmen ovino criopreservado na inseminação intracervical superficial. Uma das alternativas para contornar a barreira do transporte espermático cervical ainda não testada adequadamente, é o emprego do sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*.

No laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Steigleder (2007) conduziu experimentos que revelaram a viabilidade do emprego do sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação artificial em ovinos por laparoscopia.

O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de prenhez, empregando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação artificial intracervical superficial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Capacitação espermática.

2.1.1 Transporte espermático.

De acordo com Bedford (1970) a capacitação espermática é dependente do local de deposição dos espermatozóides no trato genital feminino, e da relação temporal entre a presença do sêmen e o momento da ovulação. Hunter (1984) destaca a sincronia entre o transporte dos espermatozóides pelo trato reprodutivo até o oviduto e a viabilidade do oócito liberado pelo ovário.

Em ruminantes, o acasalamento ocorre horas antes da liberação do oócito, e a ovulação acontece geralmente de 24 a 30 horas após início do estro. O ejaculado é de volume pequeno e com grande concentração espermática, e é depositado na porção cranial da vagina. No momento da cópula, dependendo do posicionamento da glândula peniana ante a cérvix, uma porção de espermatozóides pode ser depositada diretamente dentro do canal cervical (DOBROWOLSKI e HAFEZ, 1970).

A cérvix em ruminantes é o primeiro local de armazenamento dos espermatozóides. A colonização das criptas cervicais é rápida, e ocorre devido à interação entre o sêmen e o muco cervical presente na porção cranial da vagina. Os espermatozóides se guiam pela pressão e fluxo de saída do muco pelo canal cervical. Dentro das criptas, os espermatozóides se orientam pelo contato de suas cabeças com o epitélio. Uma população funcional de espermatozóides, capazes de promover a fecundação do oócito, é encontrada na junção útero-tubárica entre 6 e 8 horas após o acasalamento (DOBROWOLSKI e HAFEZ, 1970; HUNTER, NICHOL e CABTREE, 1980).

Em cães, eqüinos e suínos, o sêmen se acumula no útero devido ao relativo tempo prolongado de acasalamento, o que não significa, exceto em suínos, que haja a penetração da glândula na cérvix. O transporte espermático pelo trato reprodutivo das fêmeas destas espécies tem três características consideráveis. Primeiro, o volume de sêmen que é ejaculado diretamente no útero é maior e de concentração espermática menor, quando comparado a ruminantes, o que resulta em distensão dos cornos uterinos. Segundo, o aparecimento de uma população funcional de espermatozóides entre 1 a 2 horas na junção útero-tubárica. Terceiro, as condições

edematosas da junção útero-tubárica, que previnem a passagem de grandes quantidades de sêmen diretamente ao oviduto (HUNTER, 1981; HUNTER *et al.*, 2011).

A migração dos espermatozóides pelo trato reprodutivo feminino, através de seus movimentos laterais de cabeça e da atividade do flagelo espermático, é fortemente influenciada pela viscosidade dos fluídos encontrados no seu lúmen. Esses fluídos variam em quantidade e qualidade, dependendo da fase do ciclo estral. Em ambos os grupos de animais referidos acima, os espermatozóides chegam em momentos e concentrações diferentes à junção útero-tubárica. A concentração de espermatozóides que chegam ao local de fecundação é maior nas espécies em que o sêmen é depositado diretamente no útero (HUNTER *et al.*, 2011).

Os espermatozóides quando chegam ao istmo, encontram secreções viscosas ricas em glicoproteínas, que previnem o acesso de suspensões uterinas com leucócitos, as quais são prejudiciais aos espermatozóides devido a sua atividade fagocitária. Essas substâncias glicoprotéicas servem também para supressão da motilidade espermática, garantindo uma reserva de energia necessária ao espermatozóide para completar o processo de capacitação e a fecundação do oócito (SUAREZ, 1996; HUNTER e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2004; HUNTER *et al.*, 2011).

O fenômeno de ligação préovulatório de espermatozóides viáveis ao epitélio da região caudal do istmo, fornece um sofisticado mecanismo de armazenamento e regulação do número de espermatozóides viáveis que progridem pelo local de fecundação, próximo do momento da ovulação (HUNTER, 2010).

A adesão entre a membrana plasmática das células espermáticas com o oviduto é assegurada por moléculas presentes na superfície da membrana dos espermatozóides, que são capazes de se ligar a carboidratos na superfície do oviduto, de uma forma específica da espécie (TALEVI e GUALTIERI, 2010).

A supressão da motilidade induzida pelas secreções viscosas presentes nos fluídos do oviduto, e a ligação das cabeças dos espermatozóides as microvilosidades da endosalpinxe, são características dessa fase de armazenamento. A ativação e a liberação dos espermatozóides estão relacionadas com a ovulação (HUNTER, 2003).

Em suínos, os espermatozóides possuem na porção apical da cabeça, duas proteínas de ligação. A AQN1 (proteína derivada da família das espermedesinas), e

a DQH (Proteína Receptora da Heparina). A ligação dos espermatozóides se dá pela interação destas proteínas com os dissacarídeos presentes nos receptores das microvilosidades do epitélio do oviduto. Três dissacarídeos estão presentes nos receptores: a manose, a galactose, e a glicoproteína espermática de ligação (Gal β 1-3GalNAc ou SBG) (TALEVI e GUALTIERI, 2010).

A fucose, um trissacarídeo, encontrada nas glicoproteínas ANXA1, ANXA2, ANXA4, ANXA5 é reconhecida como componente chave dos receptores presentes nas microvilosidades do epitélio oviduto, para a ligação com os espermatozóides bovinos. PDC-109, BSP30K e BSPA3 são proteínas de ligação presentes na porção apical da cabeça dos espermatozóides, e a ligação entre espermatozóide/receptor, ocorre pela interação destas proteínas com a fucose (TALEVI e GUALTIERI, 2010).

A ligação epitelial, e o controle de liberação préovulatória de espermatozóides competentes, previnem a incidência de fecundação poliespermática, que é um fenômeno patológico em mamíferos (HUNTER, 2010).

Uma diferença de temperatura entre o istmo e a ampola no período pré-ovulatório, é sugerido como contribuinte para redução da motilidade espermática nesta fase de armazenamento. Uma redução de 0,7°C tem uma pequena influência na motilidade espermática, pois os espermatozóides provenientes do útero já teriam sofrido diversas modificações fisiológicas em suas membranas, peça intermediária e flagelo (HUNTER, 2005).

A função dos espermatozóides viáveis é penetrar um ou mais oócitos no local de fecundação. A explicação do porque a junção istmo ampular ser o local de fecundação deve-se ao momento da progressão do oócito pelo oviduto. Após ser recolhido na superfície do folículo de Graaf, por ação dos cílios presentes nas fimbrias, o oócito é transportado até a ampola, e após chega ao istmo. Esta fase do transporte requer de 9 a 13 minutos em coelhos, e entre 30 e 45 minutos em grandes animais. O transporte é passivo no sentido de que o oócito recém liberado, ainda revestido de células foliculares, é deslocado por ação dos movimentos ciliares e contrações da miosalpinge (HUNTER, 2003).

As contrações da miosalpinge resultam em um esfíncter fisiológico. Não somente o oócito recém liberado chega, mas também um grande número de células do *Cummulus oophorus* dissociadas em suspensão. Essa solução, junto com os

fluidos secretados no epitélio, forma um ambiente específico para o processo de capacitação e fecundação (HUNTER, 2010)

2.1.2 Eventos bioquímicos da capacitação

Os processos de espermatogênese e espermiogênese produzem espermatozóides maduros do ponto de vista morfológico e com motilidade progressiva, mas não com a habilidade de fecundação. É necessário um período de permanência no trato reprodutivo feminino, onde passam por modificações estruturais e moleculares, que o habilitam a fecundação do oócito. Estas alterações são denominadas de capacitação espermática (VISCONTI *et al.*, 1998).

A aquisição da habilidade de fecundação pelos espermatozóides mamíferos é um processo relativamente lento, pois estas células necessitam viajar uma considerável distância, do local de deposição até o local de fecundação, na porção superior da região da ampola do oviduto. Como poucas células atingem a ampola, é muito importante que elas não se tornem hábeis para fecundação precocemente, perdendo a sua habilidade de interagir com o oócito, afetando a fecundação (FRASE, 1998).

A capacitação pode ser induzida *in vitro* em numerosas espécies, pela incubação dos espermatozóides em meio definido, com componentes que mimetizam a composição eletrolítica dos fluidos do trato reprodutivo feminino. Estes meios contém substratos energéticos como o piruvato, lactato, glicose, uma fonte protéica (albumina), NaHCO_3^- e Ca^{2+} , e a heparina, um glicosaminoglicano de propriedades semelhantes, aos glicosaminoglicanos encontrados nos fluidos do trato reprodutivo (PARRISH *et al.*, 1988; VISCONTI *et al.*, 1998).

Nas espécies em que os espermatozóides são depositados na metade ou na porção caudal da cérvix, e que imediatamente entram no corpo uterino, a capacitação provavelmente começa no útero e termina no istmo do oviduto. Nas espécies de deposição intravaginal do sêmen, a capacitação inicia durante a passagem dos espermatozóides através da cérvix. Nem todos os espermatozóides são capacitados ao mesmo tempo, e o processo usualmente se estende por horas, na qual cada célula espermática mostra diferentes graus de capacitação, dependendo de sua localização no trato genital (SINOWATZ, 2010).

O trato reprodutivo feminino contém secreções com glicosaminoaglicanos, e suas concentrações e composições variam em diferentes regiões do trato feminino (LEE *et al.*, 1986). De acordo com o tipo de ligação à receptores específicos presentes na membrana dos espermatozóides, são capazes de desencadear e/ou regular os eventos relacionados à capacitação e a reação acrossomal (DOMINGUEZ *et al.*, 2008), com o pico da atividade capacitante no momento do estro (PARRISH *et al.*, 1989).

No ejaculado, há uma variabilidade no perfil proteico do plasma seminal. Estas proteínas têm a função de manutenção do potencial de fecundação dos espermatozóides, preservando a integridade de membrana das células espermáticas dos danos causados pelo choque térmico no processo de criopreservação, e também de retardar o processo de capacitação (MILLER, WINER e AX, 1990; BARRIOS *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2010). A remoção destas proteínas induz a capacitação espermática, permitindo a reação acrossomal, liberando enzimas hidrolíticas para penetração da zona pelúcida, necessária para a fecundação do oócito (CHANG, 1984).

Bedford (1970) descreveu a capacitação e a reação acrossomal como dois fenômenos distintos, sendo a capacitação uma série de mudanças que tornam o espermatozóide capaz de sofrer reação do acrossoma. A reação acrossomal ocorre pela fusão da membrana plasmática externa com a membrana acrossomal, levando a vesiculação destas membranas até o segmento equatorial. Como resultado ocorre à liberação do conteúdo do acrossoma, que é composto por enzimas que promovem a interação com subsequente digestão e penetração da zona pelúcida (PARRISH *et al.*, 1988).

Há uma relação entre as alterações que ocorrem na morfologia do acrossoma com a motilidade e o potencial de fecundação (SAACKE e MARSCHALL, 1968). Mudanças intracelulares ocorrem na capacitação como: efluxo de colesterol plasmático, aumento da fluidez de membrana, nas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e AMPc, fosforilação das proteínas quinases e mudanças na motilidade espermática (BREITBART, 2002).

Há no plasma seminal proteínas específicas chamadas de BSP (A1, A2, A3) e em conjunto com o HDL e a albumina presentes nos fluidos do trato reprodutivo feminino, atuam de maneira a alterar a composição dos fosfolípidos, induzindo a mudanças físicas nas membranas dos espermatozóides, ocorrendo o efluxo de

colesterol. Estas alterações ocorrem na região da cabeça, peça intermediária e cauda, onde estas transformações levam hipermotilidade e a reação acrossomal (WOLF, HAGOPIAN e ISHIMA, 1986; THERIEN, MOREAU e MANJUNATH, 1998).

Peptídeos como a adenosina, adrenalina, cafeína, e a calcitonina, podem estimular e regular a capacitação. O mecanismo de ação destes peptídeos, é a ativação da adenilato ciclase, conhecida como primeiro mensageiro e presente na membrana plasmática, que converte o ATP em AMPc, necessários para a fosforilação das proteínas quinases durante a capacitação (GADELLA e VAN GESTEL, 2004; FRASE, 2008; BREININGER, CETICA e BECONI, 2010).

Alguns íons específicos, como o cálcio (Ca^{2+}) e o bicarbonato (HCO_3^-), são necessários para promover a capacitação e a reação acrossomal (DE LAMIRANDE, LECLERC e GALNON, 1997).

Baixos níveis de HCO_3^- no epidídimo fazem a manutenção dos espermatozoides em um ambiente não propício para a capacitação, entretanto as altas concentrações de bicarbonato do trato reprodutivo feminino induzem os eventos da capacitação (VISCONTI *et al.*, 1998).

O papel do bicarbonato na capacitação seria de estimular a adenilato ciclase, aumentar o pH intracelular, e modificar a arquitetura e estrutura dos lipídeos presentes na membrana (GRASA, CEBRIAN-PÉREZ e MUIÑO-BLANCO, 2006).

O fluido uterino das fêmeas em estro possui duas a quatro vezes mais HCO_3^- , tendo uma correlação com aumento da expressão de um gene denominado de CFTR (regulador de condução transmembrânica da fibrose cística). O mecanismo de transcrição e expressão é regulado via hormonal, tendo maior atividade durante o estro. A função seria de mediar a entrada de HCO_3^- pelas membranas das células espermáticas, através de um transporte aniônico de HCO_3^- e Cl^- (MANNOWETZ *et al.*, 2011).

A membrana plasmática dos espermatozoides possui uma bi-camada lipídica, com quatro fosfolipídeos distribuídos de maneira assimétrica: esfingomiéline (SM) e a fosfatidilcolina (PC) na camada externa, e fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilserina (PS) na camada interna. A distribuição é mantida pela atividade combinada de fosfolipídeotransferases, movendo os quatro fosfolipídeos em um transporte bi-direcional, com os fosfolipídeos da camada interna sendo deslocados para a camada externa, e os

fosfolípidos da camada externa deslocados para camada interna. (HARRISON e GADELLA., 2005).

Na presença do bicarbonato, durante o processo de capacitação, é ativada a adenilato ciclase, desencadeando a produção de AMPc e levando a ativação das proteínas quinases. A via dependente do AMPc leva a ativação do deslocamento dos fosfolípidos pela membrana, ocorrendo uma redistribuição do colesterol (BOTTO *et al.*, 2010). Como consequência, ocorre o enfraquecimento das ligações das proteínas na superfície dos espermatozóides, gerando uma desestabilização e aumento da fluidez das membranas, necessária para fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal (HARRISON e GADELLA, 2005).

É possível distinguir dois modelos diferentes de reorganização das membranas. O primeiro seria o deslocamento dos fosfolípidos pela membrana. O segundo seria a extração do colesterol mediada por proteínas, que levam ao rearranjo da membrana, com a aquisição da habilidade de fecundação (BOTTO *et al.*, 2010).

Os canais de cálcio, localizados em regiões específicas da membrana plasmática, são responsáveis pela regulação da homeostasia do íon cálcio, necessário para várias funções espermáticas (EDDY, 1988).

As células espermáticas contêm grandes quantidades de calmodulina, e com o auxílio de enzimas presentes na membrana, regula a saída do cálcio do meio intracelular para o extracelular. Por ação de glicosaminoglicanos, como a heparina, ocorre a diminuição das concentrações de calmodulina, reduzindo a atividade dos canais de cálcio, gerando o aumento necessário de cálcio intracelular para a capacitação (LECLERC *et al.*, 1992).

A actina, componente do citoesqueleto dos espermatozóides, é organizada como uma rede intracelular, com as funções de manutenção estrutural da forma dos espermatozóides, regulação da atividade mitocondrial, motilidade espermática, capacitação e reação acrossomal (EDDY, 1988).

Os locais de fusão das membranas para exocitose do conteúdo acrossomal, estão posicionados perto do conjunto de canais de cálcio da membrana plasmática. O influxo por estes canais leva a altas concentrações de cálcio, desencadeando a ação de fosfolipases específicas (PLC), ocorrendo a despolimerização dos filamentos de actina, o que leva a fusão entre as membranas plasmática e acrossomal (SPUNGIN e BREITBART, 1996).

O controle adequado do fluxo de cálcio pela membrana dos espermatozóides é necessário para a fecundação. Danos aos sistemas de regulação do fluxo de cálcio pelas membranas espermáticas, causados pelos processos de criopreservação, geram um grande acúmulo de cálcio intracelular, predispondo os espermatozóides a uma capacitação e reação acrossomica prematura, reduzindo a capacidade de fecundação dos espermatozóides (BAILEY e BUHR, 1993).

O pH intracelular regula vários aspectos da função espermática. Embora o mecanismo que controla o pH nestas células não seja bem compreendido, é proposto dois sistemas de regulação do pH intracelular. Um seria caracterizado pelo compartilhamento de Na^+ , que depende das trocas que ocorrem entre $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. O outro seria dependente de íons extracelulares para a função. A despolarização das membranas durante a capacitação é devida em parte ao aumento da permeabilidade ao K^+ (VISCONTI *et al.*, 1998).

Uma proteína de membrana, a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, é composta por dois fosfolipídeos, alfa e beta. São conhecidos como transportadores de íons. Eles mediam a formação de gradiente eletrolítico requerido em muitos processos celulares, incluindo a manutenção do potencial de membrana, regulação do balanço osmótico, e a regulação do gradiente de concentração de Na^+ necessário para o transporte de íons e outras substâncias através da membrana plasmática. Tem uma distribuição uniforme nas regiões acrossomal, pós-acrossomal e peça intermediária. Esta enzima está ligada também a atividade da bomba de sódio e potássio. A inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ leva a um aumento na concentração de Na^+ intracelular, o que resulta em aumento de cálcio intracelular. Esse aumento de Na^+ se deve a uma queda nos níveis de K^+ intracelular, gerando a despolarização das membranas, conseqüentemente a fosforilação das proteínas tirosinas, induzindo a capacitação (THUNDATHIL, ANZAR e BUHR, 2006).

A fosforilação de proteínas que ocorre no flagelo espermático conduz a mudanças nos padrões de motilidade espermática. Estas modificações na motilidade constituem um processo de hiperativação (DEL RIO *et al.*, 2007).

A hiperativação dos espermatozóides é essencial durante o processo de capacitação, e está associada a um aumento na velocidade de deslocamento, com aumento na amplitude dos movimentos laterais de cabeça, e a geração de movimentos que lembram um “chicote”, no flagelo espermático (DE LAMIRANDE, LECLERC e GALNON, 1997).

Essas características são necessárias para a progressão dos espermatozóides pelo útero até o oviduto, permitindo atravessar as secreções mucóides presentes no seu trajeto, e encontrar o oócito para fecundação (SUAREZ, 1996).

É requerida uma alta concentração de ATP para fosforilação dos componentes da membrana, através do ciclo da adenosina 3,5 monofosfato (AMPC). A fosforilação regula as propriedades cinéticas das trocas de Na^+ e Ca^{2+} (PARRISH *et al.*, 1994).

O ATP necessário para manutenção da motilidade espermática pode ser derivado da glicólise, porém esta via metabólica é considerada de baixo rendimento energético em termos de produção de moléculas de ATP. Ao contrário, a cadeia respiratória mitocondrial tem uma estreita relação com a ATP sintetase, o que é muito mais eficiente na produção de energia, suprindo a célula com maior quantidade de ATP (STENDARDI *et al.*, 2010).

O processo de hiperativação dos espermatozóides necessita de elevados níveis de cálcio para ser desencadeado, e uma grande quantidade de cálcio intracelular é encontrada na peça intermediária e cauda dos espermatozóides (SUAREZ, 1996).

Em humanos, há uma associação positiva entre os níveis séricos de vitamina D, e o aumento do cálcio intracelular nos espermatozóides. O aumento nos níveis de cálcio intracelular, é desencadeado pela ligação da vit.D (1-25 hidroxicaliciferol) em receptores presentes em um envelope nuclear redundante (RNE). Estes RNE estão presentes entre a cabeça e a peça intermediária dos espermatozóides, e servem como reservatórios de cálcio para motilidade espermática e a reação acrossomal (JENSEN *et al.*, 2011).

De acordo com Breitbart (2002) a cascata de eventos que induz a hiperatividade espermática pode ser caracterizada pelas seguintes etapas: perda do colesterol, influxo de cálcio, elevação do AMPC e a fosforilação das proteínas do flagelo espermático. Ao passar por estas modificações o espermatozóide está apto a fixar-se à zona pelúcida através da enzima, a galactosil-transferase (Gal-T), que se liga a glicoproteína ZP3. Neste momento o espermatozóide encontra-se preparado para realizar a reação acrossômica, que é caracterizada pela estimulação de um receptor espermático da ZP3, desencadeando a exocitose do conteúdo acrossômico, caracterizando a reação acrossômica. Após a ocorrência da reação acrossômica, o espermatozóide realiza uma segunda fixação em outra glicoproteína, a ZP2,

proporcionando estabilidade na união do espermatozóide desprovido da membrana acrossômica com a zona pelúcida.

Em termos gerais as etapas da capacitação são as seguintes: alteração da motilidade espermática, fixação à zona pelúcida e a realização da reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1988).

2.2 Inseminação artificial em ovinos

2.2.1 Histórico

Os primeiros relatos de um procedimento de inseminação artificial são do século XIV, quando um chefe de uma tribo árabe coletou as secreções de uma égua em estro, e aproximando-se do melhor garanhão da tribo rival, conseguiu excitá-lo e obter uma ejaculação. O sêmen coletado em algodão limpo foi introduzido nos genitais de outra égua em estro, e foi capaz de realizar a sua fecundação, e conseqüentemente o nascimento de um potro (MIES FILHO, 1987).

Uma documentação sobre a utilização da inseminação artificial surgiu em 1780, quando o monge Lazzaro Spallanzani colheu o sêmen de um cão através do processo de masturbação, e inseminou uma cadela, conseguindo o nascimento de cães por este método (FOOTE, 1988).

A partir do século XX é que começaram estudos extensos com animais domésticos. Coube ao veterinário russo Elias Ivanov, demonstrar que a fecundação era possível quando se substituíam os líquidos produzidos pelas glândulas acessórias por um soro artificial, desde que diluíssem cuidadosamente os espermatozoides colhidos do epidídimo (MIES FILHO, 1987).

As primeiras observações a respeito da vitalidade dos espermatozoides no trato reprodutivo das ovelhas foram feitas nos anos 30, por Quilan, Maré e Roux (1932).

A partir da década de 40, através do professor Mies Filho, fomentou-se o uso da inseminação artificial com sêmen fresco em ovinos no Rio Grande do Sul (MORAES, 2002).

Os ovinos se caracterizam por apresentarem um intervalo entre gerações muito curto, tendo a puberdade alcançada em algumas raças a partir do quarto mês de vida, e o ciclo estral caracterizado por um intervalo de 16 a 21 dias. O estro tem

duração aproximada de 30 horas, com a ovulação ocorrendo em seu terço final (BICUDO *et al.*, 2005).

De acordo com Anel *et al.* (2006), a inseminação artificial vaginal ou cervical com sêmen fresco são as técnicas mais utilizadas em ovinos, rendendo resultados satisfatórios. O uso da laparoscopia, técnica que permite a deposição intrauterina do sêmen, e que foi introduzida por Killeen, Caffery e Holt (1982), permite a utilização de sêmen criopreservado, sobrepondo à barreira imposta pela cérvix ovina, e atingindo resultados superiores, quando comparados com os resultados obtidos com emprego do sêmen criopreservado na inseminação cervical.

Bicudo *et al.* (2005), dizem que a inseminação artificial exige requisitos mínimos de intensificação do manejo reprodutivo. A escolha da modalidade de inseminação depende fundamentalmente da sua adequação ao nível tecnológico do rebanho.

2.2.2 Inseminação cervical

A técnica de inseminação cervical consiste em depositar o sêmen dentro do canal cervical, com o auxílio de um espelho para visualização da cérvix (FERRA e SERENO, 2006).

Os resultados obtidos com a inseminação artificial cervical utilizando sêmen fresco são superiores a 60% de prenhez. Quando da utilização de sêmen criopreservado, os resultados podem variar de 0% a 40% (MORAES, 2002).

A cérvix ovina é um tubo fibroso, com um lúmen estreito e dobras anelares (DUN, 1955), e as taxas de prenhez, proporcionadas pela inseminação artificial intracervical com sêmen criopreservado, são reduzidas devido à inabilidade dos espermatozoides descongelados atravessarem os anéis do canal cervical (NAQVI *et al.*, 2005). O aumento na profundidade de penetração do canal cervical melhora as taxas de fertilidade (SALAMON e MAXWELL, 2000), e isso é possível em animais primíparos e múltíparos. Entretanto, quando o sêmen não é depositado profundamente no colo do útero, uma parte ou a quantidade total pode refluir para o canal vaginal, e o pH ácido da vagina é uma condição desfavorável para os espermatozoides (SZABADOS *et al.*, 2005).

Introduzindo silicone na cérvix, de 40 cordeiras e 40 ovelhas abatidas, Naqvi *et al.* (2005) avaliaram o comprimento e o número de anéis cervicais. As cordeiras

apresentaram em média 3,8 cm de comprimento e as ovelhas 5,3 cm, e o número de anéis cervicais foi semelhante entre cordeiras e ovelhas (3,2 e 3,4). As fêmeas multíparas possuem anéis mais ondulares.

Kaabi *et al.* (2006), fizeram um estudo avaliando a raça, idade, morfometria e profundidade de penetração do canal cervical de ovinos, para a utilização de dois tipos de catéteres para inseminação artificial, sendo um de uso convencional, e outro do tipo “bent” modificado, que possui uma ponteira de aço inox com 9 cm e ângulo de 45°. O cateter do tipo “bent” modificado mostrou-se mais eficiente para penetrar a cérvix.

Szabados *et al.*, (2005) realizaram um procedimento para avaliar o grau de penetração da cérvix de animais jovens, primíparas e multíparas, utilizando um cateter de Milanov modificado. É um dispositivo de aço inox, que possui 80 mm de comprimento, e a sua extremidade em formato espiral, tendo um bulbo de 3 mm de diâmetro. Este dispositivo é conectado a um tubo plástico e transparente com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro e este tubo plástico. A penetração conseguida com o uso deste dispositivo foi de até 2 cm para os animais jovens, e até 4 cm para animais primíparas e multíparas.

Kershaw *et al.* (2005) desenvolveram uma classificação para cérvix ovina quanto ao seu formato exterior, número de anéis cervicais e o seu grau de penetrabilidade. A exposição externa foi classificada em bico de pato, fenda, rosa, papila e aba. O número de anéis cervicais e o grau de penetrabilidade foram classificados em: Grau 1: cérvix com completo alinhamento dos anéis em direção a abertura do lúmen e sem interdigitações, grau 2: cérvix com mistura de anéis alinhados e desalinhados, com uma intedigitação obstruindo o centro do lúmen, e grau3: cérvix predominantemente incompleta com interdigitações e anéis não alinhados.

De acordo com Kershaw *et al.* (2005), são necessários mais estudos sobre a estrutura anatômica da cérvix da ovelha para se compreender como um procedimento de inseminação cervical poderá ser bem sucedido e desenvolvido.

2.2.3 Inseminação intrauterina

As dificuldades impostas pela barreira cervical em ovinos, quando da utilização de sêmen criopreservado nas inseminações, podem ser superadas pela

utilização de instrumentos que auxiliem na penetração cervical, ou a deposição diretamente no útero pela laparotomia ou a laparoscopia (SALAMON e MAXWELL, 2000).

O método de inseminação artificial transcervical, embora ofereça resultados satisfatórios não é uma prática regular, pois há uma variabilidade de penetração, e é um método relativamente demorado, causando estresse para o animal (SALAMON e MAXWELL, 1995b). Os traumas provocados por este método na cérvix estão associados com as reduções nas taxas de prenhez. Especula-se que o resultado negativo é imputado a um componente espermicida secretado em resposta ao trauma cervical, ocasionado pelo movimento do cateter de inseminação. WULSTER-RADCLIFFE e LEWIS (2002) mostraram em experimento, avaliando o grau de penetrabilidade e o tempo de manipulação cervical de um cateter projetado por eles para inseminação transcervical, que uma manipulação atraumática da cérvix não afeta a fertilidade, e que os índices de prenhez alcançados por esta técnica estão diretamente ligados ao local de deposição do sêmen.

A inseminação artificial por laparotomia foi utilizada pelos primeiros investigadores, para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozóides criopreservados. A introdução da deposição laparoscópica do sêmen, por Killeen, Caffery e Holt (1982), mostrou resultados muito superiores aos encontrados na inseminação artificial cervical com sêmen criopreservado.

A inseminação intrauterina por laparoscopia consiste na deposição de pequenas quantidades de sêmen nos cornos uterinos (FERRA e SERENO, 2006), resultando em aceitáveis taxas de prenhez. Porém esta técnica não é uma prática comum, pois é necessária mão-de-obra qualificada, equipamentos específicos, elevando seus custos de implantação (SANCHEZ-PARTIDA *et al.*, 1999).

Além da deposição intrauterina do sêmen, a laparoscopia pode ser usada simultaneamente no uso do diagnóstico de ovelhas com problemas reprodutivos (não desenvolvimento ou má-formação da genitália, aderências, patologias ovarianas, falta de resposta a indução do estro, para que possam ser removidas dos lotes de inseminação (ANEL *et al.*, 2005).

Outra vantagem da inseminação intrauterina por laparoscopia é a utilização de volumes inseminantes menores e com reduzida concentração de espermatozóides, quando comparada com outros os métodos de inseminação (GHALSASI e NIMBAR, 1996).

Fair *et al.* (2005), confirmam essas observações através da coleta de embriões no dia 6 pós inseminação artificial. As taxas de fecundação após a laparoscopia foram de 50% (31/62), comparada aos 19% (34/203) obtidos com a inseminação artificial via cervical.

2.2.4 Diluentes e criopreservação

O processamento de sêmen tem como objetivo preservar a capacidade fecundante dos espermatozóides; seja por um período determinado, utilizando diluidores específicos para manutenção em refrigeração, ou por um período indeterminado, através da utilização da técnica de criopreservação (OHASHI, 2001).

A criopreservação de sêmen tomou um impulso muito grande a partir dos anos 40, após a descoberta por Polge, Smith e Parkes (1949), da função crioprotetora do glicerol, o que permitiu posteriormente a congelação com sucesso de sêmen bovino. A partir desta observação, vários compostos foram testados, e mostraram êxito na proteção celular durante os processos de criopreservação. Como exemplo, podemos citar o DMSO, o etileno-glicol, a sacarose e a polivinil-pirrolidona (RODRIGUES, 1992).

Os diluentes utilizados para a preservação de sêmen devem ter pH, capacidade de tamponamento, e osmolaridade adequada, para que possam proteger os espermatozóides dos danos que ocorrem na criopreservação (SALAMON e MAXWELL, 2000).

O decréscimo da temperatura até 4°C reduz a atividade metabólica dos espermatozóides ampliando a sua duração. Entretanto, como os espermatozóides dependem basicamente de processos catabólicos para sobreviver, a manutenção da atividade metabólica leva à morte às células espermáticas por causa deste processo de envelhecimento intrínseco. Para cessar os processos metabólicos, as células precisam ser resfriadas abaixo de -130°C (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Em muitas espécies de mamíferos, a criopreservação de sêmen não é uma realidade, devido ao grande número de espermatozóides que perdem sua capacidade fecundante em função do congelamento e descongelamento (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000).

Desde que o foi demonstrado pela primeira vez por Phillips (1939) a ação protetora das membranas celulares exercida pela gema de ovo, é o componente mais

comumente utilizado para resfriamento e congelamento de espermatozóides (WATSON e MARTIN, 1975). Isso é devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em sua composição. A principal ação de proteção é a manutenção da integridade das estruturas de membranas presentes nas células, preservando a motilidade espermática e outras funções celulares (MOUSTACAS *et al.*, 2010).

Fukui *et al.* (2007), realizaram um experimento para avaliar as taxas de prenhez, comparando o sêmen criopreservado em diluente com gema de ovo, e o sêmen criopreservado em diluente contendo BSA (Albumina Sérica Bovina). Foi realizado um procedimento de inseminação artificial intrauterina por laparoscopia em tempo fixo em 60 ovelhas. As inseminações ocorreram entre 43 e 47 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona. Foi utilizado como dose inseminante 200 μL e concentração 100×10^6 spz. As taxas de prenhez foram de 66,7% nas fêmeas inseminadas com o sêmen criopreservado na presença da gema de ovo, e 65,5% com o sêmen criopreservado com BSA.

Os crioprotetores utilizados nos protocolos de criopreservação podem ser classificados como extra-celulares e intra-celulares, de acordo com a temperatura e a habilidade de atravessar a membrana. A tolerância ao estresse osmótico durante a adição e remoção do crioprotetor, é um alto preditivo para sobrevivência dos espermatozóides após a criopreservação (HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN, 1990).

O mecanismo de ação dos crioprotetores baseia-se na promoção do abaixamento do ponto de solidificação da solução de congelamento. Esta teoria fundamenta-se na propriedade de permeabilidade celular dos respectivos crioprotetores. As substâncias crioprotetoras que não possuem capacidade de atravessar a membrana celular oferecem uma ação estabilizadora sobre a membrana celular durante a congelamento. Os crioprotetores que exercem sua função penetrando na célula aumentam-lhe a sua hipertonicidade (RODRIGUES, 1992).

Os danos causados na criopreservação dos espermatozóides são responsáveis pelas alterações na sua integridade funcional, comprometendo a sua sobrevivência e a capacidade de fecundação (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Durante o processo de criopreservação, entre 10 e 50% dos espermatozóides de um ejaculado não resistem ao processo e morrem. A sobrevivência dos espermatozóides está relacionada a fatores como a qualidade do ejaculado, curva de congelamento, e o tipo de diluidor utilizado (OHASHI, 2001).

Em ovinos, entre 40 e 60% dos espermatozoides mantêm a sua motilidade após o descongelamento, porém somente entre 20 e 30% permanecem biologicamente não danificados (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Um decréscimo na temperatura causa uma alteração nos fosfolípidos das membranas, indo do estado líquido-cristalino para uma fase de gel. O resultado é o rearranjo dos componentes de membrana. Ocorre uma migração lateral destes fosfolípidos, modificando o ambiente circundante, gerando o estabelecimento de micro-domínios de lípidos e proteínas, que ficam dispostos diferentemente da estrutura bilipídica da membrana dos espermatozoides. Após o descongelamento, estas alterações afetam as atividades das proteínas de membranas, alterando a permeabilidade da membrana para água e solutos (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Diferenças na permeabilidade, elasticidade e estrutura da membrana, também determinam a sobrevivência dos espermatozoides aos processos de criopreservação (HOLT, 2000). Ocorre um ajuste no volume da célula em resposta a adição do crioprotetor. Por ação osmótica ocorre rápida saída de água do meio intracelular, seguido de um lento retorno ao volume original com a entrada do crioprotetor (HAMMERSTEDT, GRAHAN e NOLAN, 1990).

O fluxo de água é altamente dependente da curva de resfriamento. Quando a curva é muito lenta ocorre a congelação da água extracelular. Como consequência haverá concentração de soluto, criando um meio hipertônico, fazendo com que a célula perca água rapidamente, o que levará a um aumento na concentração de soluto intracelular, promovendo a morte celular por desidratação. Quando a curva de congelação é rápida a água congela rapidamente. Não há perda de água por parte da célula, promovendo com isso a formação de cristais de gelo intracelular, causando lesões nas estruturas celulares, comprometendo a função celular (HOLT, 2000).

A actina do citoesqueleto dos espermatozoides é organizada como uma rede intracelular, com a função de manutenção da forma dos espermatozoides, modulação da função mitocondrial, motilidade espermática, capacitação e reação acrossomal. A mitofusin2 é uma membrana protéica mitocondrial essencial na manutenção da morfologia e metabolismo mitocondrial. O choque térmico causa ruptura das membranas devido à instabilidade da camada bilipídica a baixas temperaturas, resultando em prematura despolimerização dos filamentos de actina, resultando em perda de estrutura, o que leva a mudanças na forma e volume das mitocôndrias, afetando a transferência da energia produzida pela fosforilação das

proteínas quinases nas mitocôndrias, até as dineínas presentes na cauda dos espermatozóides. Esta alteração no recebimento de energia pela cauda é conhecida como mudanças nos padrões de motilidade associados à criopreservação (FLORES *et al.*, 2010).

O espermatozóide ovino é mais suscetível a danos na criopreservação entre as temperaturas de -10°C e -25°C . Em experimento para determinar qual a melhor taxa de resfriamento para atravessar esta zona crítica, Byrne *et al.* (2000) utilizaram duas curvas de resfriamento; uma $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (rápida) e outra a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (lenta), e realizaram dois procedimentos de inseminação artificial, cervical e laparoscópica, com o sêmen criopreservado nestas duas velocidades de resfriamento. As taxas de prenhez obtidas foram de 13% (4/30) na IA cervical utilizando sêmen congelado em curva rápida, 0% (0/30) com sêmen congelado em curva lenta. As fêmeas inseminadas por laparoscopia apresentaram taxas de prenhez de 60% (18/30) para sêmen congelado em curva rápida e 40% (12/29) para sêmen congelado em curva lenta.

De Lima *et al.* (2010), desenvolveram experimento para avaliar a influência de quatro sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado, que consistem em: refrigerador doméstico, sem a utilização de bolsas com água em cima das palhetas (RS), refrigerador doméstico com bolsas de água em cima das palhetas (RC), balcão refrigerado com sem bolsas de água (BS), e balcão refrigerado com bolsas de água (BC). O sistema refrigerador sem bolsa de água apresentou taxa média de refrigeração de $-1,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. O sistema refrigerador com bolsa de água $-0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. O sistema balcão sem bolsa de água teve média de $-2,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e o tratamento balcão com bolsa de água resultou em uma curva de resfriamento de $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Após a descongelação do sêmen, não foi observada diferenças significativas nos padrões de motilidade e vigor espermático, e na morfologia espermática, sugerindo que as velocidades das curvas de resfriamento de cada sistema proposto, não exerceram efeito no sêmen, após o resfriamento.

Sanchez-Partida *et al.* (1999), avaliaram aditivos como a prolina e a glicina, em diluentes a base de TRIS, para criopreservação de sêmen ovino. Os resultados mostram que o sêmen congelado em diluente adicionado de prolina, teve 65,2% de espermatozóides vivos, sendo 32,3% com acrossomo intacto, no pós-descongelamento. No grupo em que o sêmen foi congelado com diluente mais glicina, 66,4% dos espermatozóides estavam vivos, destes, 43,5% estavam com o

acrossomo intacto após o descongelamento. Estes resultados foram superiores aos obtidos no grupo controle do experimento (congelado apenas com TRIS), que teve 43% de espermatozóides vivos, sendo 35,6% com o acrossomo intacto. Os índices de fertilidade, obtidos da utilização destes dois diluentes, nas inseminações cervicais foram de 18,1% (8/44) para prolina e 11,6% (5/43) para glicina. Nas inseminações por laparoscopia, as taxas de prenhez foram 43,2% (19/44) e 40% (16/40) respectivamente. No grupo controle, o número de animais prenhez nas inseminações cervicais foi de 20,9% (9/43), e por laparoscopia 66,6% (28/42).

2.2.5 Métodos de indução e sincronização do estro

O sucesso dos programas de inseminação artificial é dependente da disponibilidade de boas técnicas de controle e detecção do estro. Em geral, os melhores resultados são obtidos quando a inseminação acontece antes da ovulação (HOLT, 2000).

A possibilidade de induzir e/ou sincronizar o estro e a ovulação em um grupo de fêmeas tem como objetivo, auxiliar os programas de inseminação artificial, facilitando o manejo e concentrando o período de parição dos animais (BRITT e ROCHE, 1988).

De Souza *et al.* (1995), realizaram um experimento para avaliar o momento das ovulações em ovelhas Corriedale. Nas fêmeas observadas em estro natural, 85% (48/56) ovularam em período de 24 a 32 horas após o seu início. Outra observação feita pelos pesquisadores, é que a presença do macho pode antecipar em até 8 horas o momento da ovulação nas fêmeas com estro induzido. No grupo que esteve na presença de machos vasectomizados, as ovulações ocorreram aproximadamente 65,2 horas após a remoção dos dispositivos. No grupo que não esteve sob influência dos machos, as ovulações ocorreram 73,8 horas.

O efeito macho é explicado pela ação de feromônios presentes na lã e cera que se acumulam ao redor dos olhos do carneiro. Pelo olfato e estímulos visuais relacionados à presença física do macho, ocorre à ativação do hipotálamo, estimulando a liberação de LH pela hipófise anterior. Ocorre um aumento na produção e na quantidade de pulsos de LH, induzido o seu pico, levando a ovulação e a formação de um corpo lúteo, com a manifestação do estro entre 19 e 21 dias depois da exposição ao macho (FERRA e SERENO, 2006).

O uso de dispositivos vaginais, impregnados com progesterona, associado à aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) com dose entre 250 e 500 UI, no momento de sua retirada, permite induzir o estro com grande eficiência, ao mesmo tempo que sincroniza a ovulação (BICUDO *et al.*, 2005).

A liberação da progesterona dos dispositivos é indicada pela elevação das concentrações plasmáticas deste hormônio, e os valores normalmente encontrados são ligeiramente inferiores aos determinados em ovelhas em diestro. A queda nos níveis de progesterona é muito mais rápida após a retirada das esponjas do que durante a luteólise fisiológica do ciclo estral, onde as concentrações basais são atingidas em 4 horas (HANK e COOPER, 1977; PEARCE e ROBINSON, 1985).

Simonetti, Blanco e Gardón (2000), conduziram experimento para avaliar a quantidade necessária de acetato de medroxiprogesterona (MAP) para a sincronização do estro em ovinos, e a sua influência nas taxas de prenhez. No experimento, os animais foram divididos em três grupos: Grupo I (40 mg), grupo II (50 mg) e grupo III (60 mg). Após 14 dias, foi feita a retirada dos dispositivos e analisada a quantidade real absorvida de hormônio pelos animais. A quantificação resultou: Grupo I (21,62 mg), grupo II (19,70 mg) e o grupo III (24,85 mg). Posterior a isto, cada grupo foi analisado com relação à quantidade de animais que entraram em estro após a retirada dos dispositivos. No grupo I, 79,27% (65/82) dos animais mostraram estro, no grupo II, 77,42% (144/186) e o grupo III, 80,87% (224/277), não havendo diferença estatística entre os grupos. Também não houve diferença estatística com relação ao momento do início do estro, após a retirada dos dispositivos. Grupo I (55,94 horas), grupo II (56,74 horas) e grupo III (57,70 horas). Alguns animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente, e inseminados pela via cervical com sêmen fresco. No grupo I, a taxa de prenhez foi de 43,75% (7/16), grupo II 52,94% (9/17) e o grupo III, 45,45% (5/11), não havendo diferença estatística entre os grupos inseminados.

Salamon e Maxwell (2000) escrevem que o acetato de fluorogestona (AFE) na concentração de 30 mg, rende taxas de prenhez maiores do que o MAP na concentração de 60 mg, e que o melhor momento para inseminação seria entre 48hrs e 65hrs após a remoção dos dispositivos.

Os protocolos utilizados para indução/sincronização do estro, normalmente têm duração aproximada de 12 dias, podendo se estender por até 14 dias (SALAMON e MAXWELL, 2000). Bicudo *et al.* (2003), avaliaram a capacidade de

indução do estro de um protocolo de curta duração (6 dias), comparado aos tradicionais. Foram utilizadas 60 fêmeas da raça Suffolk, que receberam dispositivos vaginais no dia 0 (D0). No quarto dia (D4), foi aplicado 100 µg de cloprostenol, e de 350 a 400 UI de eCG. Após 48 horas (D6) os dispositivos foram retirados. Em outro grupo de ovelhas foi empregado o protocolo tradicional, com 12 dias de implante, e na remoção foi feita a aplicação de 350 a 400 UI de eCG. Os animais em estro foram agrupados em 3 períodos de distribuição: (< 30; 30 a 54 e 55 a 72 horas após remoção dos implantes). No período compreendido entre 55 e 72 horas, foram observados 100% de ocorrência de estro no protocolo de curta duração, e 88,5% de estro no protocolo tradicional, concluindo que o protocolo proposto, foi eficaz na indução/sincronização do estro durante a estação reprodutiva, com a totalidade deles se manifestando em até 72 horas após a remoção dos implantes.

3 ARTIGO

EMPREGO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO E CAPACITADO *IN VITRO* NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL SUPERFICIAL EM OVINOS

Carlos Alberto Brigoni e Silva¹, Lis dos Santos Marques², Rafael Escobar Navarro²,
José Luiz Rodrigues³

RESUMO

A inseminação artificial intracervical superficial em ovinos é uma técnica simples, de baixo custo e eficiente no emprego do sêmen fresco. Por outro lado, particularidades do aparelho reprodutivo da fêmea ovina, a quantidade de células espermáticas que sobrevivem ao pós-congelamento bem como a capacitação precoce de espermatozóides durante o processo de criopreservação, dificultam o emprego desta técnica com sêmen criopreservado, fazendo-se necessária a deposição intrauterina, com auxílio da laparoscopia. Desconhece-se a eficiência da inseminação artificial intracervical superficial em ovinos, empregando-se sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*. O experimento foi realizado com objetivo de determinar as taxas de prenhez com o sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: sêmen fresco (SF); sêmen congelado cervical (SCC); sêmen congelado laparoscopia (SCL); sêmen congelado capacitado cervical (SCCC); e sêmen congelado capacitado laparoscopia (SCCL). Todas as fêmeas receberam doses inseminantes com concentração de 200×10^6 sptz. As inseminações ocorreram em um período de 52 a 60 horas após a retirada dos dispositivos de progesterona. Os diagnósticos de prenhez foram realizados com auxílio da ultrassonografia 30 dias após as inseminações. As taxas de prenhez observadas foram: No grupo SF 42,30% (11/26), SCC 23,07% (6/26), SCL 54,16% (13/24), SCCC 25,92% (7/27), SCCL 48,14% (13/27), não existindo diferença estatística entre os grupos experimentais. O experimento realizado mostrou que é

¹ Mestrando do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, FAVET, UFRGS.

² Graduandos FAVET, UFRGS.

³ Professor Doutor do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, FAVET, UFRGS.

possível obter prenhez, empregando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação artificial pela via cervical em ovinos.

Palavras chaves: reprodução de ovinos, manipulação de sêmen, diagnóstico de gestação.

ABSTRACT

The superficial intracervical insemination in sheep is a simple, low cost and efficient technique using fresh semen. Still, the particularities of the female tract, the amount of sperm cells which survive and the early capacitation during the cryopreservation process, difficult the use of this technique with cryopreserved semen, making it's necessary to intrauterine with the aid of laparoscopy. It's unknown the efficiency of superficial intracervical insemination in ovine, using cryopreserved and in vitro capacitated semen. The experiment was carried out with the objective to determine the pregnancy rate of ewes inseminated with cryopreserved and in vitro capacitated semen. The females were randomly distributed among five experimental groups: fresh semen (SF), frozen semen cervical (SCC), frozen semen laparoscopy (SCL), frozen semen in vitro capacitated cervical (SCCC), frozen semen in vitro capacitated laparoscopy (SCCL). All females received dosis with 200×10^6 sptz per insemination. The inseminations were performed from 52 to 60 hours after the withdrawal of progesterone implants. The pregnancy diagnosis was conducted by ultrasonography 30 days after inseminations. The observed pregnancy rates was: SF 42,30% (11/26), SCC 23,07% (6/26), SCL 54,16% (13/24) SCCC 25,92%, SCCL 48,14% (13/27). Our experiment showed that in sheep it's viable the superficial cervical artificial insemination using cryopreserved and in vitro capacitated semen.

Keywords: sheep reproduction, semen handling, pregnancy diagnosis.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial contribui como ferramenta para o avanço da produção animal, pois permite a disseminação e manutenção de genes desejáveis dentro de uma população, através da multiplicação do potencial reprodutivo de um macho provado (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000).

O processamento de sêmen tem como objetivo preservar a capacidade fecundante dos espermatozóides; seja por um período determinado, utilizando diluidores específicos para manutenção em refrigeração, ou por um período indeterminado, através da utilização da técnica de criopreservação (OHASHI, 2001).

Salamon e Lightfoot (1967) obtiveram os primeiros nascimentos a partir da utilização do sêmen ovino criopreservado. No entanto, ainda hoje as alterações sofridas pelos espermatozóides durante o processo da criopreservação, aliadas as dificuldades no transporte espermático através da cérvix, constituem desafios para o emprego eficiente em larga escala do sêmen congelado.

Alguns fatores contribuem para reduzida viabilidade do sêmen ovino criopreservado, como a composição dos diluidores, a concentração dos crioprotetores, resfriamento, congelamento e descongelamento, e a qualidade do ejaculado (SALAMON e MAXWELL, 1995a).

FAIR *et al.* (2005) destacam que, o local de deposição do sêmen criopreservado exerce influência sobre as taxas de fecundação. Essas observações foram feitas através da coleta de embriões no dia 6 pós-inseminação artificial. As taxas de fecundação após a laparoscopia foram de 50% (31/62), superiores aos 19% (34/203) obtidos com a inseminação artificial cervical.

Atualmente, o desafio é identificar alternativas técnicas que permitam o emprego eficiente, e em larga escala, do sêmen ovino criopreservado na inseminação intracervical superficial. Uma das alternativas para contornar a barreira do transporte espermático cervical ainda não testada é o emprego do sêmen criopreservado capacitado *in vitro*.

No laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Steigleder (2007) conduziu experimentos que revelaram a viabilidade do emprego do sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação artificial em ovinos por laparoscopia, obtendo 48,39% (15/31) de prenhez.

O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de prenhez com o sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação artificial intracervical.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização do experimento

As inseminações foram realizadas em propriedades rurais dos municípios de Viamão e Capivari do Sul, no Estado do Rio Grande do Sul, nos meses de fevereiro e abril de 2011. A determinação da capacitação espermática foi realizada no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Animais

No experimento foi utilizado um reprodutor Texel, e 130 fêmeas (Texel e sem raça definida).

Reagentes

Os componentes dos meios de diluição para criopreservação do sêmen, indução e determinação da capacitação espermática, utilizados no experimento, foram da empresa Sigma-Aldrich[®].

Coleta e criopreservação do sêmen

O sêmen foi coletado com auxílio de vagina artificial, e utilizado somente os ejaculados que apresentavam motilidade superior a 70% e vigor 3 (anexo 1). Determinou-se a concentração espermática, e realizou-se a diluição do ejaculado (200×10^6 spz/0,5 mL), utilizando tris gema e glicerol, de acordo com formulação de Salamon e Maxwell (2000) (anexo 2). O sêmen envasado foi mantido à temperatura de 4°C por um período de 3 horas para estabilização.

Após o processo de estabilização, as palhetas foram colocadas em vapor de nitrogênio por 20 minutos e posteriormente, imersas em nitrogênio líquido (anexo 2).

No laboratório foram realizadas análises pós-descongelamento de morfologia e concentração espermática, motilidade e vigor pelo teste de termo-

resistência rápido (TTR), de todas as partidas de sêmen produzidas, para garantir a qualidade das doses empregadas nas inseminações (anexo 1).

Sincronização do estro

As fêmeas foram sincronizadas através de um dispositivo intravaginal, impregnado com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), confeccionados no laboratório. Os dispositivos permaneceram por 11 dias e no momento da remoção, os animais receberam 200 UI de gonadotrofina corônica equina (eCG - Folligon[®]) pela via intramuscular.

Capacitação espermática *in vitro*

O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 60 segundos e avaliado nas suas características de motilidade e vigor. O conteúdo das palhetas foi colocado em eppendorf e centrifugado por 10 min a 1200 RPM. Os sobrenadantes foram retirados, e aos *pellets* formados foram adicionados 250 µL ou 500 µL de meio Fert-TALP HEPES modificado (anexo 3), levando em consideração a inseminação intracervical ou intrauterina, respectivamente. Feita a adição do meio capacitante, o sêmen permaneceu em banho-maria por 20 min. antes do início das inseminações, para que ocorresse a indução do processo de capacitação.

Inseminação artificial

As fêmeas foram divididas aleatoriamente nos cinco grupos experimentais e colocadas em jejum hídrico e alimentar por 12 horas. As inseminações ocorreram em um intervalo entre 52 e 60 horas após a retirada dos dispositivos vaginais. O primeiro grupo inseminado, SF, foi submetido à inseminação artificial intracervical com sêmen fresco. O grupo SCC foi inseminado via intracervical superficial com sêmen criopreservado. O grupo SCL foi inseminado por laparoscopia utilizando sêmen criopreservado. O grupo SCCC foi inseminado via intracervical superficial, utilizando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*. O grupo SCCL foi inseminado por laparoscopia, utilizando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*.

Nas inseminações intracervicais superficiais, as fêmeas foram contidas e seu posterior elevado, sendo o sêmen depositado com auxílio do espéculo vaginal. No grupo SF, o sêmen utilizado foi coletado no dia da inseminação, e diluído em tris-gema, sendo o volume e a concentração das doses utilizadas de 250 μL e 200×10^6 spztz respectivamente. No grupo SCC, o sêmen foi descongelado, centrifugado e o *pellet* formado ressuspense no sobrenadante para atingir o volume de 250 μL como dose inseminante.

Para as inseminações por laparoscopia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica, e posteriormente erguidos em um ângulo entre 45 e 60°, mantendo a cabeça das fêmeas voltada para o solo. Foi realizada uma tricotomia nos animais que apresentassem excesso de lã no local onde seriam feitas as incisões para o posicionamento dos trocateres. Para a assepsia do local, foi utilizado álcool-iodado. Uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita na região abdominal cranial do úbere e próxima a linha alba, permitindo a colocação de um trocater com 5 mm de diâmetro, por onde foi introduzida a lente do laparoscópio. Após se insuflou CO_2 com a finalidade de distender a cavidade abdominal, criando espaço para a manipulação e posicionamento dos cornos uterinos para a realização da IA. Foi feita uma segunda incisão paralela a primeira, para a colocação de outro trocater, propiciando o acesso do aplicador com a dose inseminante. As fêmeas inseminadas nos grupos SCL e SCCL receberam uma dose inseminante de 250 μL em cada corno uterino.

Determinação da capacitação espermática

As análises da capacitação espermática das partidas de sêmen utilizadas nas inseminações, foram realizadas através da técnica da coloração por clortetraciclina (CTC), descrita por Perez *et al.* (1995) com modificações (anexo 4). A primeira determinação consistiu em descongelar uma dose de sêmen, e quantificar o número de espermatozoides capacitados em decorrência do processo de criopreservação. A segunda determinação foi procedida para avaliar a capacitação induzida pela centrifugação das amostras seminais. A dose de sêmen foi descongelada e centrifugada por 10 minutos a 1200 RPM, o sobrenadante retirado e o *pellet* ressuspense com sobrenadante até atingir o volume de 250 μL . A terceira

determinação foi realizada para avaliar a capacitação induzida pelo meio Fert-TALP.

Os procedimentos para execução da técnica de coloração por CTC (anexo 4) foram realizados conforme descrito: Foi retirada de cada dose de sêmen uma amostra de 10 μ L, que posteriormente foi diluída em 190 μ L de PBS. Adicionou-se a amostra diluída, 2 mL de polivinil-pirrolidona (PVP), e encaminhada para centrifugação por 5 minutos a 2330 RPM. Descartou-se o sobrenadante, e ao *pellet* formado foi adicionado 45 μ L de solução de CTC (anexo 4). Após 20 segundos, foi feita a adição de 8 μ L de paraformoldeído. As lâminas para quantificar o número de espermatozoides capacitados, foram confeccionadas pingando duas gotas de 10 μ L cada. Sobre cada gota foi colocada uma lamínula, e as suas bordas seladas com esmalte incolor. Em cada lâmina foram avaliados 100 espermatozoides utilizando microscópio de epifluorescência com filtro de excitação de 458 nm.

A análise do padrão de distribuição do CTC nos espermatozoides, para a determinação da quantidade de espermatozoides não capacitados, e capacitados com ou sem reação de acrossoma, foi realizada de acordo com o proposto por Curry (2000) (anexo 4). Os espermatozoides que apresentaram uma distribuição do CTC por toda a sua superfície foram considerados não capacitados. Espermatozoides que apresentaram fluorescência na região acrossomal com segmento post-acrossomal não fluorescente, foram considerados capacitados e com acrossoma intacto. Espermatozoides capacitados e com reação acrossomal, apresentaram fluorescência na região equatorial.

Diagnóstico de prenhez

Os diagnósticos de prenhez foram realizados aos 30 dias após as inseminações, utilizando um aparelho de ultrassonografia equipado com um transdutor linear retal de 5 MHz.

Análise estatística

As taxas, de capacitação nos diferentes tipos de processamento do sêmen, e de prenhez das fêmeas inseminadas, foram analisadas através do teste de Qui-quadrado.

RESULTADOS

A capacitação espermática avaliada imediatamente pós-descongelamento, pós-centrifugação, e após a indução com 250 e 500 μL de meio Fert-Talp, apresentou diferença estatística entre os grupos apenas em relação ao número de espermatozoides capacitados e que não sofreram reação acrossômica (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da capacitação espermática de amostras de sêmen submetidas a diferentes processamentos.

VOLUME (μL)	PROCESSAMENTO	ESPERMATOZOIDEOS CAPACITADOS					
		TOTAL		SEM REAÇÃO		COM REAÇÃO	
		N	%	N	%	N	%
500	Descongelado	373	33,91	285	25,91 ^a	88	8,00 ^a
250	Centrifugado	446	40,55	365	33,18 ^b	81	7,36 ^a
250	Fert-TALP	972	88,36	890	80,90 ^c	82	7,45 ^a
500	Fert-TALP	988	89,92	902	82,00 ^c	86	7,82 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,008$)

Os dados da Tabela 2 mostram que as taxas de prenhez nos grupos experimentais, após as inseminações artificiais com sêmen submetido ou não a capacitação espermática foram semelhantes, e variaram de 23,07% a 54,16%.

Tabela 2: Determinação das taxas de prenhez aos 30 dias, nos grupos submetidos ou não a capacitação espermática pré-inseminação.

GRUPO	SÊMEN		I.A.	PRENHEZ	
			Local	%	(N/IA)
SF	Não capacitado	Fresco	Intracervical	42,30	(11/26)
SCC	Não capacitado	Congelado	Intracervical	23,07	(06/26)
SCL	Não capacitado	Congelado	Laparoscopia	54,16	(13/24)
SCCC	Capacitado	Congelado	Intracervical	25,92	(07/27)
SCCL	Capacitado	Congelado	Laparoscopia	48,14	(13/27)

DISCUSSÃO

Salamon e Lightfoot (1967), há mais de 40 anos relataram os primeiros nascimentos de cordeiros, produtos da inseminação artificial com sêmen congelado, e até hoje esta técnica não alcançou eficiência para o seu emprego em larga escala. Autores como King *et al.* (2004), Fair *et al.* (2007), Paulenz, Adnoy e Soderquist

(2007), testaram alternativas com o objetivo de buscar, de maneira eficiente, o emprego do sêmen criopreservado, na inseminação artificial cervical em ovinos.

Diferente dos autores acima citados acredita-se, que uma alternativa real para facilitar o transporte espermático através da cérvix, seria a indução prévia da capacitação espermática. Em nosso laboratório, Steigleder (2007) mostrou a viabilidade da inseminação artificial intrauterina com sêmen previamente capacitado, através da laparoscopia.

Ao contrário dos índices de capacitação encontrados por Steigleder (2007) no sêmen descongelado (1,7% com acrossomo intacto e 2,8%, com reação acrossomal), os índices observados no presente estudo foram superiores, com 25,91% de espermatozóides com acrossomo intacto, e 8% com reação acrossômica. O importante a destacar, é que neste experimento, a capacitação espermática induzida pela criopreservação (33,91%) foi 7,5 vezes superior a encontrada por Steigleder (2007).

Valores superiores aos aqui encontrados, para espermatozóides capacitados e sem reação de acrossoma foram descritos por Rodrigues - Almeida *et al.* (2006), que observando os efeitos da manutenção do sêmen a uma temperatura de 5°C, por períodos de 6 horas e 24 horas, encontraram 42,5% e 44,5% respectivamente, de espermatozóides capacitados com acrossoma intacto. Estes dados mostram que a manutenção dos espermatozóides em temperaturas de refrigeração, induz a capacitação.

Além do índice de capacitação induzido pela criopreservação, foram acrescentadas observações a respeito do procedimento de centrifugação, na qual a taxa de espermatozóides capacitados e com acrossomo intacto foi de 33,18%. Não ocorreram diferenças significativas nos índices de espermatozóides que sofreram reação de acrossoma, nos diferentes tratamentos.

Provavelmente os índices de espermatozóides capacitados obtidos no experimento, tanto no grupo avaliado imediatamente após o descongelamento quanto no grupo descongelado e submetido à centrifugação, se devem ao fato de que os danos provocados pela criopreservação e manipulação, não estão relacionados apenas com a redução na motilidade, mas principalmente ao comprometimento estrutural e bioquímico dos espermatozóides, o que pode interferir sobre os eventos da capacitação (SANCHEZ-PARTIDA *et al.*, 1999; SALAMON e MAXWELL, 2000; CORMIER e BAILEY, 2003; DOMINGUEZ *et al.*, 2008).

Na literatura são descritos dois métodos de separação espermática, o gradiente de percoll, e a migração ascendente (*swim-up*) (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995). No experimento foi realizada apenas a centrifugação dos espermatozóides, para que fosse retirada a maior quantidade possível de diluidor e líquido seminal presentes, e ao *pellet* de espermatozóides formado adicionou-se meio Fert-TALP. *In vitro*, a capacitação espermática é desencadeada a partir da exposição dos espermatozóides a substâncias indutoras, como a heparina, cafeína, cálcio ionóforo (A23187) (GRASA, CEBRIAN-PÉREZ e MUIÑO-BLANCO, 2006). No experimento, foi acrescentado ao meio Fert-TALP, 5,76 µg/mL de Heparina, 1,1 µg/mL de Hipotaurina e 0,183 µg/mL de Epinefrina. Estas concentrações foram idênticas as utilizada por Steigleder (2007) em seu experimento.

Os volumes empregados para reconstituição das doses inseminantes, respeitaram os diferentes tipos de procedimentos de inseminação. Na avaliação da capacitação espermática em relação à quantidade de meio capacitante, os dados dos grupos avaliados não apresentaram diferença significativa. Quando da adição de 250 µL de meio Fert-TALP modificado, se obteve 81,35% de espermatozóides capacitados, sendo 80,90% com acrossoma intacto. A adição de 500 µL induziu a capacitação em 89,92% dos espermatozóides, sendo 82% com acrossoma intacto. Estes dados foram semelhantes aos descritos por Steigleder (2007), que obteve 88,6% de espermatozóides capacitados com a utilização de meio capacitante.

Ferrari *et al.* (2000), avaliando dois meios para indução da capacitação de espermatozóides ovino, publicaram resultados semelhantes aos obtidos neste experimento, com relação ao número de espermatozóides capacitados e sem reação acrossomal. Um meio com alta concentração iônica induziu a capacitação em 96,5% dos espermatozóides, sendo 80,2% com o acrossomo intacto. O outro meio, composto por 20% de soro de ovelha em estro e 2,5 µg/mL de heparina, induziu a capacitação em 97,5% dos espermatozóides, sendo que 83,7% estavam com o acrossomo intacto.

Observando os dados de prenhez da tabela 2, no grupo inseminado pela via cervical com sêmen fresco (SF), 42,30% (11/26) das fêmeas estavam prenhez. Este valor é semelhante à taxa de prenhez obtida por Sanchez-Partida *et al.* (1999), 42% (21/50), e por Simmonetti, Blanco e Gardón (2000) que testando concentrações de 40 e 60 mg de acetato de medroxiprogesterona para sincronização de estro,

alcançaram resultados de prenhez nas inseminações cervicais com sêmen fresco, de 43,75% (7/16) e 45,45% (5/11) respectivamente.

Moraes (2002) descreve taxas de 0 a 40% de prenhez na inseminação cervical com sêmen congelado. Os 23,07% de prenhez observados no experimento, após a deposição do sêmen congelado na cérvix, situam-se no intervalo de percentuais referido pelo autor acima. Gil *et al.* (2003), testaram dois tipos de diluentes e a profundidade de deposição do sêmen no canal cervical, e também alcançaram resultados de prenhez (21 e 26%), que situam-se no intervalo descrito por Moraes (2002).

Das fêmeas inseminadas por laparoscopia com sêmen congelado, 54,16% emprenharam, percentual semelhante aos descritos por Fair *et al.* (2005), 50% (31/62), e por Steigleder (2007), 56,70% (17/30).

NEILD *et al.* (2005) escrevem que a célula espermática uma vez capacitada, a sua sobrevivência dentro do trato reprodutivo feminino é reduzida. Porém, quando analisamos a quantidade de espermatozóides induzidos à capacitação no laboratório (tabela 1), e que teoricamente seria a mesma quantidade de espermatozóides capacitados no momento das inseminações, aliado aos resultados das inseminações pela via cervical e laparoscópica utilizando sêmen criopreservado e previamente capacitado (tabela 2), há uma contrariedade na afirmação feita pelo autor acima.

Os índices de prenhez obtidos nas inseminações alcançaram 25,92% (7/27) nas inseminações pela via cervical (SCCC), e 48,14% (13/27) nas inseminações por laparoscopia (SCCL). O resultado do grupo inseminado por laparoscopia corrobora os dados alcançados por Steigleder (2007), que obteve em seu experimento 48,39% (15/31) de prenhez empregando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*.

As taxas de prenhez deste experimento, somadas às reportadas por Steigleder (2007), comprovam a eficiência do emprego de espermatozóides previamente capacitados em inseminações artificiais com o auxílio da laparoscopia.

Afirmações que poderiam explicar os resultados das inseminações dos grupos experimentais discutidos até agora, são dadas por Barrios *et al.* (2000), Moura *et al.* (2010) e Hunter *et al.* (2011). Proteínas presentes, tanto no plasma seminal, quanto no trato reprodutivo de fêmeas em estro, teriam como funções, garantir a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, com isso evitando uma capacitação precoce, e a supressão da motilidade espermática, o que

garantiria uma reserva energética necessária para completar o processo de capacitação e fecundar o oócito.

Não estão disponíveis na literatura, dados referentes ao emprego do sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação cervical superficial em ovinos.

CONCLUSÃO

O reduzido número de animais utilizados neste trabalho, não permitiu comprovar estatisticamente a viabilidade do emprego do procedimento testado, nas inseminações em larga escala. Porém o experimento mostrou que é possível obter prenhez utilizando sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, na inseminação intracervical superficial em ovinos.

As taxas de prenhez obtidas no grupo inseminado com sêmen criopreservado e capacitado previamente, corroboram com os resultados obtidos por Steigleder (2007), comprovando a viabilidade do emprego do sêmen criopreservado e capacitado *in vitro*, nas inseminações por laparoscopia.

Os resultados obtidos da análise da determinação da capacitação espermática, nos diferentes tipos de processamento, mostram que além da criopreservação, o tipo de manipulação (centrifugação) que o sêmen sofre pode induzir a uma capacitação precoce dos espermatozóides, comprometendo sua sobrevivência no trato reprodutivo feminino.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Levando-se em consideração as limitações do uso de sêmen criopreservado na inseminação artificial na espécie ovina, e a necessidade de procedimentos específicos para deposição do sêmen diretamente no útero, torna-se necessário a busca por novos procedimentos que permitam transpor a barreira imposta pela cérvix, permitindo a utilização em larga escala do sêmen criopreservado.

As questões relacionadas aos fenômenos reprodutivos que ocorrem na espécie ovina necessitam de mais esclarecimentos, o que continua sendo um desafio para os especialistas em reprodução.

Para o futuro é interessante, a realização de experimentos capazes de identificar diluentes que reduzam os danos causados pela criopreservação, aumentando a duração dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino.

Outro aspecto a considerar, seria quais os fenômenos que acontecem na cérvix ovina, e que influenciam na sobrevivência dos espermatozóides.

O desenvolvimento de equipamentos práticos ao uso, e que permitam a deposição do sêmen via cervical causando o mínimo de estresse o animal, permitindo a difusão do sêmen criopreservado nas inseminações em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; De La FUENTE, L.F.; PAZ, P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, Stonehan, v.63, n.4, p. 1235-1247. 2005.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; de PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, suplemento 2, p. 30-42. 2006.

BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Cryopreservation alters the Ca^{2+} flux of bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 45-51. 1993.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 1. 2000.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; CALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrana. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 5, p. 1531-1537. 2000.

BEDFORD, J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, New York, v. 2, suplemento 2, p. 128-158. 1970.

BICUDO, S.D; SOUZA, D.B. Associação de progestágenos, prostaglandinas e eCG, em protocolos de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas suffolk. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 27, n.3, p. 473-477. 2003.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SILVA MAIA, M.S.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Aspectos da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 3, p. 127-130. 2005.

BOTTO, L.; BERNABÒ, N.; PALESTINI, P.; BARBONI, B. Bicarbonate induces membrane reorganization and CBR1 and TRPV1 endocannabinoid receptor migration in lipid microdomains in capacitation boar spermatozoa. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 238; p. 33-41. 2010.

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 265-275. 2000.

BREININGER, E.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 74, n. 6, p. 1036-1049. 2010.

BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 139-144. 2002.

BRITT, J.H.; ROCHE, J.F. Indução e sincronização da ovulação. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. Editora Manole, 1988. p. 632-648.

CHANG, M.C. The meaning of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 5, n. 2, p. 45-50. 1984.

CORMIER, N.; BAILEY, J.L. A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 177-185. 2003.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v. 5, p. 46-52. 2000.

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GALNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 175. 1997.

DE LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R.; RUMPF, R.; NEVES, J.P. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, p. 835-844. 2010.

DE SOUZA, C.J.H.; CHAGAS, L.M.; MOURA, A.; MORAES, J.C.F. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágenos e eCG. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 277-281. 1995.

DEL RIO, M.J.; GODOY, A.; TORO, A.; ORELLANA, R.; CORTÉS, M.E.; MORENO, R.D.; VIGIL, P. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. **Revista Internacional de Andrologia**, v. 5, n. 4, p. 368-373. 2007.

DOBROWOLSKI, W.; HAFEZ, E.S.E. Transport and distribution of spermatozoa in the reproductive tract of the cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 31, p. 940-943. 1970.

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

DUN, R.B. The cervix of the ewe. Its importance in artificial insemination of sheep. **The Australian Veterinary Journal**, v. 31, n. 4, p. 101-103. 1955.

EDDY, E.M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Ed.). **The Physiology of the Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 3-54.

EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. **J.Reprod.Fert.** v.70, p. 47-53, 1984.

FAIR, S.; HANRAHAN, J.P.; O'MEARA, C.M.; DUFFY, P.; RIZOS, D.; WADE, M.; DONOVAN, A.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, Stonehan, v. 63, n. 7, p. 1995-2005. 2005.

FAIR, S.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A.; DUFFY, P.; O'MEARA, C.M.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Hormonal relationship during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.284-294. 2007.

FAO. **Food Outlook. Global market analysis**. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em 1 de Junho de 2011.

FERRA, J.C.; SERENO, J.R.B. **Inseminação artificial em ovinos**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2006.

FERRARI, S.; BARNABE, V.H.; ZUGE, R.M.; ZOGNO, M.A. Effect of two ram sperm capacitating media on acrosome reaction and zona-free hamster oocyte penetration test. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V,37. 2000.

FLORES, E.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. **Theriogenology**, Stonehan, v. 74, p. 354-363. 2010.

FOOTE, R.H. in: HAFEZ, H.S.E. **Reprodução animal**. Editora Manole. 1988: 4º Ed. p. 601-631.

FRASE, L.R. Sperm capacitation and acrosome reaction. **Human Reproduction**. Oxford, v. 13, p. 9-19. 1998.

FRASE, L.R. The role of small molecules in sperm capacitation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1356-1359. 2008.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M. Fertility of ewes inseminated intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 53, n. 4, p. 959-962. 2007.

GADELLA, B.M.; VAN GESTEL, R.A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 307-319. 2004.

GHALSASI, P.M.; NIMBAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 69-73. 1996.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIN, N; SODERQUIST, L.; RODRÍGUES-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**. v.59, p.1157-1170, 2003.

GRASA, P.; CEBRIAN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. **Reproduction**, v. 132, p. 721-732. 2006.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 2, p. 73-88, 1990.

HARRISON, R.A.P.; GADELLA, B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 342-351. 2005.

HANK, H.W.; COOPER, B.S. Sperm transport into the cervix of the ewe after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 44, p. 638-644. 1977.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Stonehan, v. 53, p. 47-58. 2000.

HUNTER, R.H.F.; NICHOL, R.; CRABTREE, S.M. Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 20, p. 1869-1875. 1980.

HUNTER, R.H.F. Sperm transport and reservoir in the pig oviduct in relation to the time of the ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 63, p. 109-117. 1981.

HUNTER, R.H.F. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 72, p. 203-211. 1984.

HUNTER, R.H.F. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, p. 157-170. 2003.

HUNTER, R.H.F.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the fallopian tubes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 243-250. 2004.

HUNTER, R.H.F. The fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 45, p. 281-290. 2005.

HUNTER, R.H.F. Sperm head binding to epithelium of the oviduct isthmus is not an essential preliminary to mammalian fertilization. **Zygote**, Cambridge, v. 19, p. 265-269, 2010.

HUNTER, R.H.F.; COY, P.; GADEA, J.; RATH, D. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p. 191-197. 2011.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**, Brasília, 2009. v.37.

JENSEN, M.B.; BJERRUM, P.J.; JESSEN, T.E.; NIELSEN, J.E.; JOENSEN, U.N.; OLESEN, I.A.; PETERSEN, J.H.; JUUL, A.; DISSING, S.; JORGENSEN, N. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 26, p. 1307-1317. 2011.

KAABI, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; CHAMORRO, C.A.; BOIXO, J.C.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewes cervix: A postmortem study. **Theriogenology**, Stonehan, v. 66, p. 1876-1883. 2006.

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

KILLEEN, I.D.; CAFFERY, G.J.; HOLT, N. Fertility of ewes following intra-uterine insemination with aid of a laparoscope. **Aust. Soc. Reprod. Biol**, v.14 p. 104, 1982.

KING, M.E.; MCKELVEY, W.A.C., DINGWALL, W.S.; MATTEWS. K.P.; GEBBIE, F.E.; MYLNE, M.J.A; STEWART, E; ROBINSON, J.J. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, Stonehan, v.62, p.1236-1244. 2004.

LECLERC, P.; SIRARD, M.A.; CHAFOULCAS, J.G.; LAMBERT, R.D. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v. 94, p. 23-32. 1992.

LEE, C.N.; BUSHMEYER, C.S.M.; FIRST, N.L.; AX, A.L. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p. 861-867. 1986.

MANNOWETZ, N.; WANDERNOTH, P.; HORNING, J.; RUFFING, U.; WENNEMUTH, G. Early activation of sperm by HCO_3^- is regulated hormonally in the murine uterus. **International Journal of Andrology**. V. 34, p. 153-164. 2011.

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

MIES FILHO, F. Inseminação artificial. **Sulina**. 1987. p. 327-750.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-Binding Proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.42, p. 899-915. 1990.

MORAES, J.C.F. O emprego da inseminação artificial em ovinos. Bagé: **Embrapa Pecuária Sul**. 2002.

MOURA, P.P.; FRANCO, M.M.; SILVA, T.A.S.N.; ROCHA, T.L.; LEAL, D.R.; PASSOS, P.I.B.; NEVES, J.P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1154-1159. 2010.

MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, F.G.; LAGARES, M.A.; LOAIZA-ECCHEVERRI, A.M.; VARAGO, F.C.; NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; ARRUDA, R.P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, Stonehan, v. 75, n. 2, p. 300-307. 2010.

NAQVI, S.M.K.; PANDEY, G.K.; GAUTAM, K.K.; JOSHI, A.; GEETHALAKSHMI, V.; MITTAL, J.P. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, p. 337-344. 2005.

NEILD, D.N.; GADELLA, B.M.; AGÜERO, A.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, p. 47-56. 2005.

OHASHI, O.M. **Inseminação artificial em bubalinos**. In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. Livraria Varela. 2001. p. 97-110.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 38, p. 1171-1180. 1988.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; HANDROW, R.R.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. **Biology of Reproduction**. v. 40; p.1020 – 1025. 1989.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; UGUZ, C.; FIRST, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-Monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.51, p. 1099-1108. 1994.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p. 859 – 869, 1995.

PAULENZ, H.; ADNOY, T.; SODERQUIST, L. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.49, p.1-7, 2007.

PEARCE, D.T.; ROBINSON, T.J. Plasma progesterone concentrations, ovarian and endocrinological responses and sperm transport in ewes with synchronized oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v. 75, p. 49-62. 1985.

PEREZ, L.J.; VALCARCÉL, A.; De LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.F.; BALDASSARE, H. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, Stonehan, v.45, p. 1037-1046. 1995.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.666. 1949.

QUILAN, J.; MARÉ, G.S.; ROUX, L.L. The vitality of the spermatozoa in the merino ewe with special reference to its practical application in breeding. **Rep.Vet. Rs. Un. Afr.** v.18, p. 381-870. 1932.

RODRIGUES-ALMEIDA, F.A.; ÁVILA, C.O.; ACHONDO, A.; SÁNCHEZ, B.E.; JIMÉNEZ, J.A. Effect of dilution, refrigeration and cryopreservation on capacitation-like changes in ram spermatozoa. **American Society of Animal Science**. V,57, p.288-291, 2006.

RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões. *Anais da VII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*. 1992: p. 55-79.

SAACKE, R.G.; MARSCHALL, C.E. Observations on the acrosomal cap fixed and unfixed bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 16, p. 511-514. 1968.

SALAMON, S.; LIGHTFOOT, R.J. Fertilization and embryonic loss in sheep. **Nature**, London, v. 216, p. 194-195. 1967.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, p. 1-36. 1995b.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 77-111. 2000.

SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 20, p. 280-288. 1999.

SIMONETTI, L.; BLANCO, M.R.; GARDÓN, J.J. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.38, p. 243-247. 2000.

SINOWATZ, F. In: HYTTEL.P., SINOWATZ.F., VEJSTELD.M. Essentials of domestic animal embryology. **Saunders Elsevier**. 2010: p. 56 – 66.

SPUNGIN, B.; BREITBART, H. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. **Journal of Cell Science**, London, v. 109, p. 1947-1955. 1996.

STEIGLEDER, L.F. **Inseminação artificial por laparoscopia em ovinos utilizando espermatozoides descongelados e capacitados *in vitro***. 2007. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

STENDARDI, A.; FOCARELLI, R.; PIOMBONI, P.; PALUMBERI, D.; SERAFINI, F.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during *in vitro* capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v. 34, p. 247-255. 2010.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 17, p. 331-335. 1996.

SZABADOS, T.; GERGATZ, E.; VITINGER, E.; TASI, Z.; GYÖKÉR, E. Lambing rate as a functional of artificial insemination depth in ewe lambs, primiparous and multiparous ewes. **Acta Agrária Kaposváriensis**, v. 9, p. 41-49. 2005.

TALEVI, R.; GUALTIERI, R. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. **Theriogenology**, Stonehan, v. 73, p. 796-801. 2010.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, p. 768-776. 1998

THUNDATHIL, J.C.; ANZAR, M.; BUHR, M.M. Na^+/K^+ ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 75, p. 308-317. 2006.

VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G.D.; BAILEY, J.L.; NING, X.; FORNES, M.; KOPF, G.S. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 19, p. 242-248. 1998.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 28, p. 153-159. 1975.

WOLF, D.E.; HAGOPIAN, S.S.; ISHIMA, S. Changes in sperm plasma membrane lipid infusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 102, p. 1372-1377. 1986.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; LEWIS, G.S. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and transversing the cervix on semen quality and fertility. **Theriogenology**, Stonehan, v.58, p. 1361-1371. 2002.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Ed.).
The Physiology of the Reproduction. New York: Raven Press. 1988. p. 135-172.

ANEXOS

ANEXO 1

TABELA REFERENTE AOS DADOS DAS COLETAS E CONGELAÇÃO DE SÊMEN, E ANÁLISES PÓS-DESCONGELAMENTO.

DATA	CARNEIRO	PARTIDA	Nº SALTOS	MOT. VIGOR	VOL. mL	CONC. EJAC.	Nº DOSES	MOT/VIG. DESC.	CONC. 0,5mL	% PAT. ESP.	MOT/VIG. TTR (3hrs)
10/12/10	124	10.12	2	70/3	1,8	2,19X10 ⁶	19	60/4	205,50X10 ⁶	1,5	30/3
14/12/10	124	14.12	3	80/3	3,5	2,62X10 ⁶	45	60/4	194,25X10 ⁶	2	30/3
16/12/10	124	16.12	2	80/4	2	2,45X10 ⁶	25	60/4	204,00X10 ⁶	2	30/3
21/12/10	124	21.12	3	70/4	3	2,78X10 ⁶	41	50/3	198,00X10 ⁶	1,5	30/3
23/12/10	124	23.12	3	80/3	2,5	1,27X10 ⁶	16	50/3	206,45X10 ⁶	4	30/3
06/01/11	124	06.01	2	70/4	2,4	1,47X10 ⁶	18	50/4	193,50X10 ⁶	2,5	30/3
11/01/11	124	11.01	1	70/4	1	1,88X10 ⁶	10	50/3	203,25X10 ⁶	3	30/3
18/01/11	124	18.01	3	70/4	3,3	2,53X10 ⁶	42	50/3	201,25X10 ⁶	3	30/3
20/01/11	124	20.01	3	70/3	2,6	2,66X10 ⁶	35	60/4	202,00X10 ⁶	2,5	30/3
25/01/11	124	25.01	2	70/3	1,5	2,39X10 ⁶	18	60/4	198,45X10 ⁶	3,5	30/3
27/01/11	124	27.01	2	70/3	2	2,86X10 ⁶	29	50/3	205,45X10 ⁶	4	20/2

ANEXO 2

PROTOCOLO COLETA – DILUIÇÃO – CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

-TRIS (SALAMON & MAXWELL, 2000)

ETAPA 1: PREPARO DILUENTE (Preparo na véspera)

	100 mL	200 mL
- TRIS (Tris-hidroxi-amino-etano)	3,63 g	7,26 g
- Ácido Cítrico	1,99 g	3,98 g
- Glicose	0,50 g	1,00 g
- Estreptomicina	100 mg	200 mg
- Penicilina G 100,000 U.I.	156 mg	312 mg
*Glicerol (5%)	5 mL	10 mL
*Gema de ovo (15%)	15 mL	30 mL
- Água Bidestilada q.s.p	73,624 mL	147,248 mL

*Adicionar somente no momento da diluição

- pH: 6,8
- Osmolaridade: 325 mOM.

ETAPA 2: COLETA

- Preparo do microscópio, mesa aquecedora, lâminas e lamínulas.
- Lavagem, secagem, montagem da vagina artificial.
- Preparo do banho-maria à 30°C
- Contenção do manequim.
- Preparo da vagina artificial, tendo uma temperatura interna entre 42 e 44°C
- Levar carneiro até o manequim. No momento do salto é feito o desvio do pênis para penetração na vagina artificial.
- Retirada de amostras do sêmen coletado para:

* Análise de morfologia espermática é realizada adicionando em 1000 μL de solução de formol-citrato, 50 μL de sêmen e analisando em microscópio de contraste de fase contando 200 células.

* A análise de concentração do sêmen é realizada com uma diluição de 1:100. Adiciona-se 10 μL de sêmen a 990 μL de solução de formol-citrato, e a contagem dos espermatozóides é feita em câmara de Neubauer.

* Motilidade e vigor, analisados de forma subjetiva em lâmina e lamínula com uso de microscópio.

- Colocar o sêmen coletado em banho-maria a 30°C

ETAPA 3: DILUIÇÃO E CONGELAMENTO

- Diluição por gotejamento até completar o volume total desejado. O sêmen e diluente devem estar a 30°C no momento da diluição.
- Envase do sêmen diluído em palhetas de 0,5 mL, utilizando álcool polivinílico para lacrar as palhetas
- Após diluição e envase, estabilizar o sêmen a uma temperatura de 4°C por 3 horas.

* A estabilização ocorre colocando o sêmen envasado e um termômetro com escala de 0-100°C, em um recipiente (foi utilizada uma mamadeira de plástico). Este conjunto é colocado em um frasco de vidro com álcool em seu interior, de maneira que o volume de álcool cubra por inteiro o recipiente do sêmen. Este frasco de vidro é colocado dentro de uma caixa de isopor, e adiciona-se água até a metade desta. Posterior, é feita a adição de cubos de gelo. A caixa é fechada para evitar trocas de temperatura com o ambiente. Na tampa há um furo por onde passa o termômetro, permitindo o controle da temperatura, até atingir 4°C. O sêmen permanece por 3 horas nesta temperatura.

- Passado o tempo de estabilização, procede-se o pré-congelamento. Em uma caixa de isopor, coloca-se nitrogênio líquido até atingir uma altura de 5 cm aproximadamente. As palhetas são colocadas a uma altura de

10 cm do nitrogênio, permanecendo em vapor de nitrogênio por 20 minutos. Passado este tempo, o congelamento é feito mergulhando as palhetas no nitrogênio líquido.

ANEXO 3**Fert-TALP**

	REAGENTES	CATÁLOGO	mM	100 mL
MEIO ESTOQUE	NaCl	S5886	113,93	665,8 mg
	KCl	P5405	3,21	23,9 mg
	NaH ₂ PO ₄	S5010	2,90	3,5 mg
	CaCl ₂ .2H ₂ O	C7902	2,00	29,4 mg
	MgCl ₂ .6H ₂ O	M2393	0,78	15,8 mg
	Lactato de Sódio	L1375	10,00	142 µL
	Vermelho de Fenol	P5530	0,03	1,0 mg
	Penicilamina	P5125	3 mg/mL	0,30 mg
	NaHCO ₃ ⁻	S5761	2,50	21,0 mg
	HEPES	H6147	20,00	476,8 mg
	Gentamicina	G1264	50 µg/mL	5,0 mg
	Piruvato de Sódio	P4562	0,25	2,8 mg
HHE	Heparina	H3149	1,0 UI/mL	5,76 µg/mL
	Hipotaurina	H1384	10 µM	1,1 µg/mL
	Epinefrina	E4250	1 µM	0,183 µg/mL
	BSA			6 mg/mL

Preparo do Meio estoque:

- Pesar separadamente os componentes.
- Diluir os componentes em um copo de Becker com parte da água total.
- Acertar o volume total com um balão volumétrico.
- Deixar em agitador magnético por uma hora.
- Corrigir o pH em 7,36.
- Medir a osmolaridade (280-300 mOM)
- Filtrar e manter a 4°C.

Preparo para uso:

- Colocar em um copo de Becker, 10 mL de meio estoque
- Pesar 60 mg de BSA e adicionar ao meio, não provocando agitação.
- Adicionar a gentamicina e o piruvato
- Colocar em banho Maria por uma hora.
- Após dissolução do BSA, diluir alíquotas prontas de HHE para cada 2 mL de meio.
- Equilibrar em banho-maria por 1 hora.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO POR CLORTETRACICLINA (CTC)

1 SOLUÇÃO TAMPÃO CTC

240 mg TRIS

760 mg NaCl

Água destilada q.s.p 100 mL

Filtrar com filtro de 0,22 µm

2 SOLUÇÃO DE CTC (pH final 7,8)

2 mg CTC

4,4 mg cisteína (L-cysteine hidrocloreto monohidrato)

5 mL solução tampão CTC aquecido à 37°C

3 COLORAÇÃO

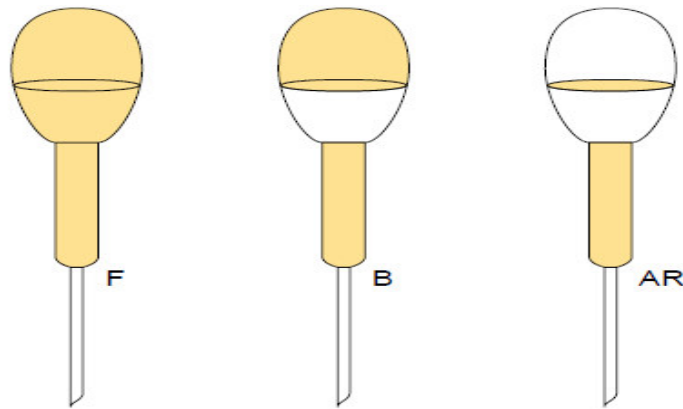
- Diluir em 190 µL de PBS, 10 µL de sêmen
- Adicionar 2 mL de uma solução 2% (w/v) de PVP em PBS.
- Centrifugar a amostra por 5 minutos a 2330 RPM.
- Remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* formado com 45µL de meio capacitante nas amostras que foram induzidas à capacitação. Nas amostras em que não houve indução da capacitação, substituir o meio capacitante por PBS.
- Adicionar 45µL da solução de CTC fresco (preparado no dia)
- Após 20 segundos, adicionar 8 µL de solução de paraformaldeído a 12,5% (w/v) em 0,5M TRIS (pH 7,4).
- Colocar 1 gota de 10µL da amostra corada entre lâmina e lamínula.
- Selar com esmalte incolor
- Ler em epifluorescência com filtro 355-425 nm na linha de excitação com emissão de fluorescência em filtro RKP 455.

INTERPRETAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES

F: Todo amarelo (intensa fluorescência em toda a cabeça), espermatozoides não capacitados.

B: Capacitado e com acrossoma intacto (fluorescência na região acrossomal).

AR: Capacitado com reação acrossomal (fluorescência na zona equatorial).



CURRY (2000).