

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

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR LAPAROSCOPIA EM OVINOS UTILIZANDO
ESPERMATOZÓIDES DESCONGELADOS E CAPACITADOS *IN VITRO*.

LUIZ FELIPE STEIGLEDER

PORTO ALEGRE
2007.

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

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR LAPAROSCOPIA EM OVINOS UTILIZANDO
ESPERMATOZÓIDES DESCONGELADOS E CAPACITADOS *IN VITRO*.

Autor: Luiz Felipe Steigleder

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues.

Porto Alegre

2007

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Rodrigues, pelos ensinamentos, pela oportunidade de realizar este projeto, pela confiança, incentivo e amizade.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, bolsistas e estagiários do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução: Fabiana Forell, Arnaldo Diniz Vieira, Lucila Carboneiro dos Santos, Rafael Rodrigues, Artur Emílio Freitas e Silva, Mateus da Costa Lange, Alexandre Aiquel Vaz Costa, Alexander Nívia Osuna, Daniela Scherer da Silva, Cristiano Feltrin, Natália Schmidt Arruda, Leandro Franke Gonçalves, Eduardo Allix, Felipe Ledur Ongaratto, Maicon Faria e Priscila Serpa e aos funcionários João Roberto Lopes Moraes e Leda Gomes Mendes, agradeço pelo apoio e amizade durante estes anos de convivência.

As famílias Aginsky e Schmidt que oportunizam a realização deste trabalho abrindo as portas das suas casas agradeço pela confiança e amizade.

Agradeço a Márcio Scherer Aginsky pelo auxílio, pelas idéias, pelo companheirismo e a amizade.

Aos meus amigos de longe e de perto que de certa forma participaram desta conquista e torceram por mim.

Agradeço a José Antonio Lima Teixeira, Berenice Teixeira e Christina Vieira da Cunha, pelo incentivo, amizade e apoio durante este trabalho.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais Luiz Paulo Steigleder e Maria Helena Steigleder que não mediram esforços para que este projeto fosse realizado, a minha irmã Vanessa Steigleder Neubauer, meu cunhado Ericson Neubauer que me apoiaram nessa jornada.

Agradeço em especial à minha noiva Laisa Teixeira e a sua filha Maria Eduarda pelo amor, carinho, cumplicidade, compreensão, dedicação e incentivo durante a realização deste trabalho.

E agradeço a DEUS por tudo que ele me proporcionou durante a minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µL	microlitros
°	graus
°C	graus celsius
cm	centímetros
CO ₂	dióxido de carbono
CTC	clortetraciclina
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
Fert-TALP	meio para capacitação e fecundação
IA	inseminação artificial
IMV	instrumentos médicos veterinários
Kg	quilogramas
MAP	acetato de medroxiprogesterona
mg	miligramas
MHz	megahertz
mL	mililitros
mm	milímetros
N	número
nm	nanômetros
PVP	polivinil-pirrolidona
RA	reação acrossômica
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SC ₁	sêmen congelado experimento 1
SC ₂	sêmen congelado experimento 2
SCC ₁	sêmen congelado capacitado experimento 1
SCC ₂	sêmen congelado capacitado experimento 2
SCNC ₁	sêmen congelado não capacitado experimento 1
SCNC ₂	sêmen congelado não capacitado experimento 2
SF ₂	sêmen fresco experimento 2
Sperm-TALP	meio para preparação dos espermatozóides
sptz	espermatozóide

SRD	sem raça definida
<i>swim-up</i>	migração ascendente
TRIS	(hidroximetil) - aminometano
UI	unidade internacional
v/v	volume/volume
ZP	zona pelúcida

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da capacitação espermática (experimento 1).....	28
Tabela 2: Taxa de prenhez de ovelhas com estro sincronizado e inseminadas com sêmen descongelado e capacitado <i>in vitro</i> (experimento 1).....	28
Tabela 3: Taxa de capacitação espermática (experimento 2).....	29
Tabela 4: Taxa de prenhez de ovelhas com estro sincronizado e inseminadas com sêmen fresco, descongelado e capacitado <i>in vitro</i> (experimento 2)	29

RESUMO

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR LAPAROSCOPIA EM OVINOS UTILIZANDO ESPERMATOZÓIDES DESCONGELADOS E CAPACITADOS *IN VITRO*.

Dissertação de Mestrado

Autor: Luiz Felipe Steigleder

Orientador: José Luiz Rodrigues

A técnica de inseminação artificial (IA) por laparoscopia em ovinos foi utilizada pela primeira vez em 1982, o que tornou viável a utilização econômica do sêmen congelado nesta espécie. Os experimentos foram realizados com o objetivo de determinar as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por laparoscopia, utilizando 50×10^6 espermatozóides descongelados e capacitados *in vitro*. No experimento 1, foi utilizado sêmen de um reprodutor e 67 ovelhas com estros sincronizados, divididas aleatoriamente entre os grupos: sêmen congelado (SC₁) e sêmen congelado capacitado *in vitro* (SCC₁). As ovelhas foram submetidas à IA, com 50×10^6 espermatozóides, 56 e 60 horas, respectivamente, após a retirada das esponjas impregnadas com progesterona. No grupo SCC₁, a taxa de prenhez foi de 48,39% (15/31) significativamente superior a do grupo SC₁ de 25% (9/36). No experimento 2, utilizou-se um reprodutor e 100 ovelhas com os estros sincronizados, distribuídas aleatoriamente entre três grupos: sêmen fresco (SF₂), SC₂ e SCC₂. Nos grupos SF₂ e SC₂ as fêmeas foram inseminadas com 100×10^6 espermatozóides e 56 horas após a retirada da progesterona. No grupo das fêmeas inseminadas com espermatozóides capacitados *in vitro*, utilizou-se 50×10^6 espermatozóides e um intervalo de 60 horas após retirada da progesterona. As taxas de prenhez diagnosticadas nos diferentes grupos experimentais foram: SF₂ 60,9% (25/41), SC₂ 56,70% (17/30) e SCC₂ 44,90% (13/29), não existindo diferença estatística entre os grupos. Os experimentos realizados mostraram a viabilidade do

emprego, na espécie ovina, da IA por laparoscopia utilizando 50×10^6 espermatozoides descongelados e capacitados *in vitro*.

Palavras chaves: ovino, inseminação artificial, laparoscopia, sêmen congelado, *in vitro*, capacitação.

ABSTRACT**LAPAROSCOPIC OVINE ARTIFICIAL INSEMINATION USING
FROZEN/THAWED *IN VITRO* CAPACITATED SPERMATOZOA**

Master's Dissertation

Author: Luiz Felipe Steigleder

Adviser: José Luiz Rodrigues

The ovine artificial insemination (AI) by laparoscopy was described the first time in 1982, since this time frozen semen became a tool for use under field conditions. Today one research goal is to achieve high pregnancies rates after AI using a reduced number of frozen/thawed spermatozoa per dosis. The experiments were carried out with the objective to determine the pregnancy rate of ewes inseminated by laparoscopy, using 50×10^6 thawed and in vitro capacitated spermatozoa. In the experiment 1 was used semen of one fertile ram and 67 ewes with synchronized estrus. The females were randomly distributed among two experimental groups: inseminated with frozen semen (SC1) or frozen and in vitro capacitated semen (SCC1). The ewes were submitted to the AI with 50×10^6 spermatozoa, 56 (SC1) or 60 (SCC1) hours, respectively, after retreat of the intra vaginal device impregnated with progesterone. In the group SCC1 the pregnancy rate was 48,39% (15/31) significantly different from the 25% (9/36) observed in the group SC1. In the experiment 2 was used one fertile ram and 100 ewes with synchronized estrus, distributed randomly among three groups: inseminated with fresh semen (SF2), 100×10^6 spermatozoa, SC2, 100×10^6 frozen spermatozoa and SCC2, 50×10^6 frozen and in vitro capacitated spermatozoa. The moment of the laparoscopic AI was the same as used in the experiment 1: 56 (SF2 and SC2) or 60 (SCC2) hours, respectively, after retreat of the intra vaginal device impregnated with progesterone. The observed pregnancy rates were similar among the experimental groups: SF2 60,9% (25/41), SC2 56,70% (17/30) and SCC2 44,90% (13/29). Our experiments showed the ability of frozen/thawed and in vitro capacitated ovine spermatozoa to in vivo fertilize and promote the development of pregnancies. In conclusion, it

is possible to use 50×10^6 frozen/thawed and in vitro capacitated spermatozoa for ovine laparoscopic AI.

Keywords: ovine, artificial insemination, laparoscopy, frozen semen, in vitro, capacitation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Inseminação Artificial em ovinos.....	14
2.2 Capacitação espermática.....	17
3 ARTIGO	
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR LAPAROSCOPIA EM OVINOS UTILIZANDO ESPERMATOZÓIDES DESCONGELADOS E CAPACITADOS <i>IN VITRO</i>	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Animais.....	23
Coleta e Processamento do Sêmen.....	23
Sincronização do Estro.....	24
Capacitação <i>in vitro</i>	24
Determinação da Capacitação <i>in vitro</i>	25
Inseminação Artificial.....	26
Diagnóstico de Gestação.....	26
Análise Estatística.....	26
Experimento 1.....	27
Experimento 2.....	27
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira possui estados com importante número de animais, como Rio Grande do Sul, Bahia, Ceará, Piauí, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul. No cenário mundial, referente a caprinos e ovinos, em número de animais, a China tem o maior rebanho do mundo, seguida, pela ordem, por Índia, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Reino Unido, Turquia e Espanha.

O mercado nacional da ovinocultura e da caprinocultura encontra-se aquecido e o consumidor, parte fundamental do processo, busca, cada vez mais, por produtos e empresas que ofereçam, acima de tudo, qualidade. Já o criador tem o desafio de incrementar seu negócio, investindo em genética e estando atento a todas as transformações do mercado que possam agregar valor à sua criação.

Isso pode ser creditado a um conjunto de fatores: a profissionalização das associações de criadores e dos próprios ovinocultores; a busca por informação e tecnologia que contribuam em prol do desenvolvimento da criação e os constantes investimentos em genética, nutrição e sanidade que, ao contrário do que muitos pensam, não podem ser encarados como custo.

A ovinocultura tem procurado aumentar a sua participação no agronegócio brasileiro, pela maneira que ela esta crescendo em algumas regiões, como por exemplo, os estados do Nordeste.

A espécie ovina apresenta particularidades reprodutivas, sendo a principal a sazonalidade, que possibilita, com o auxílio das técnicas de sincronização de estros, realize três partos em dois anos. Desde os primórdios da utilização da IA, ao final do século XIX, o rebanho ovino vem destacando-se no cenário mundial como um dos líderes no emprego desta biotécnica de reprodução. De acordo com Bicudo, Sousa e Takada (2003) a inseminação artificial é dentre as biotécnicas de reprodução a que proporciona com os menores custos os maiores resultados nos programas de melhoramento animal. A identificação de grupos de genes responsáveis por fenótipos desejáveis, bem como a disseminação destas características na descendência, são procedimentos que podem ser acelerados com a incorporação adequada

das biotécnicas de reprodução, como a IA, aos diferentes sistemas de produção animal. O elevado custo de manutenção e execução dos programas de seleção, para uma eficiente identificação e multiplicação de reprodutores, exige hoje o emprego da inseminação com sêmen congelado e de outras biotécnicas como as relacionadas à transferência de embriões.

Lamentavelmente ao contrário da vaca e da cabra, a cérvix da ovelha representa uma barreira, que impede à utilização em larga escala da inseminação intrauterina via transcervical. Isto não se deve somente ao tamanho físico do canal e de um diâmetro estreito do lúmen (mesmo no estro), mas devido também à existência de uma série excêntrica de quatro a oito anéis em forma de funil (NAQVI, *et al.*, 2005). A incorporação da utilização do laparoscópio na rotina da IA ovina (KILLEN e CAFFERY, 1982) permitiu a transposição da barreira cervical, com a deposição do sêmen diretamente na cavidade uterina. Este procedimento proporcionou um incremento no emprego do sêmen congelado com taxas de prenhez compatíveis com os custos econômicos da biotécnica (RODRIGUES *et al.*, 1988). De acordo com Salamon e Maxwell (1995), levando-se em consideração as características do ejaculado ovino, a exigência de doses inseminantes com elevada concentração é hoje um dos fatores limitantes para uma efetiva multiplicação, através da inseminação artificial por laparoscopia com sêmen criopreservado, do potencial reprodutivo de carneiros considerados excepcionais.

A busca por procedimentos que viabilizem a redução da concentração espermática da dose inseminante, com a manutenção das taxas de prenhez economicamente viáveis, é atualmente um dos desafios que aguardam as respostas da pesquisa científica. Uma alternativa ainda não testada na procura da redução do número de espermatozóides é a associação do momento da IA por laparoscopia com o emprego de espermatozóides capacitados *in vitro*. Os experimentos realizados tiveram por objetivo determinar as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por laparoscopia com 50×10^6 espermatozóides descongelados e previamente capacitados *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IA em ovinos

No âmbito da indústria da produção animal a IA é empregada para acelerar a multiplicação de genótipos considerados superiores, maximizando o uso de carneiros melhoradores e, ao mesmo tempo, é também um meio eficaz de controle sanitário das doenças sexualmente transmissíveis (EVANS e MAXWELL, 1987).

De acordo com Dunn (1955) primeiro utilizou-se o sêmen fresco depositado na entrada da cérvix, que permitiu a obtenção de taxas de prenhez em torno dos 60%, que foram consideradas eficientes. A utilização do sêmen fresco possibilitou o emprego de um reprodutor para um número maior de fêmeas, do que usualmente é utilizado na monta natural, podendo inseminar por via cervical em média 10 ovelhas por ejaculado. Como o ejaculado ovino proporciona um pequeno número de inseminações por conter um reduzido volume, é prioridade a procura de alternativas para aumentar o número de doses inseminantes. A diluição do sêmen foi uma das soluções utilizadas, permitindo desta forma aumentar o número de fêmeas inseminadas.

Salamon, Maxwell e Firth (1979) observaram que a utilização de sêmen diluído refrigerado além de aumentar o número de doses inseminantes, prolongou o tempo de viabilidade dos espermatozóides, podendo desta forma ser conservado por períodos mais extensos, possibilitando o transporte do sêmen entre propriedades e difundindo material genético. O sêmen refrigerado pode ser utilizado por um período máximo de 24 horas, sem que ocorram perdas significativas na motilidade e vigor (COLAS e COUROT, 1976). Robertson e Watson (1987) constataram uma redução na motilidade espermática entre 24 e 48 horas de armazenamento e não recomendaram o emprego do sêmen refrigerado depois de transcorrido um período de 24 horas.

Colas (1979) determinou a taxa de prenhez de 150 ovelhas inseminadas utilizando sêmen refrigerado ou congelado de cinco carneiros ile-de-france na estação reprodutiva. A IA foi realizada por via cervical e as taxas de prenhez obtidas com sêmen congelado, com uma concentração de 800×10^6 spz/dose (34,3%), foi inferior ao obtido com sêmen fresco refrigerado com concentração

de 500×10^6 spz/dose (60.9%). Milczewski *et al.* (2000) compararam a IA com sêmen refrigerado via cervical com a via laparoscópica e obtiveram como resultados 21,74% (5/23) e 85,71% (18/21), respectivamente.

Bernardi (2005) destaca que o uso do sêmen refrigerado tem vantagens práticas e econômicas, o que o torna eficiente para o uso na rotina da IA a campo. A autora enfatiza, entretanto, que apesar dos numerosos estudos sobre diluentes, a dificuldade de preservação adequada do sêmen é ainda um obstáculo para o uso extensivo do sêmen refrigerado em programas do IA em ovinos.

Halbert *et al.* (1990) tentaram desenvolver uma técnica de IA transcervical utilizando sêmen congelado. O problema encontrado pelos autores e que até os dias atuais não foi resolvido de forma satisfatória é a passagem completa da cérvix. De acordo com King *et al.* (2004) o número de experimentos em que a deposição uterina do sêmen através da cérvix foi conseguida é baixo, pois em somente 2% das ovelhas a penetração da cérvix é completa. Kershaw *et al.* (2005) ressaltam que é necessário estudar a estrutura anatômica da cérvix da ovelha para ganhar uma compreensão de como um procedimento de IA transcervical bem sucedido pode ser desenvolvido.

Naqvi *et al.* (2005) introduziram silicone na cérvix de cordeiras e de ovelhas com a finalidade de moldá-la. Os autores avaliaram em seu experimento o comprimento ($5,3 \pm 0,15$ cm nas ovelhas e $3,8 \pm 0,12$ cm nas cordeiras) e o número de anéis cervicais ($3,4 \pm 0,22$ nas ovelhas e $3,2 \pm 0,19$ nas cordeiras). O número de anéis cervicais foi semelhante entre as cordeiras e as ovelhas, mas por outro lado, a condição de fêmea múltipara das ovelhas, lhes confere uma cérvix maior e com os anéis mais ondulados.

Em uma tentativa de aumentar as taxas de transposição cervical Barbas *et al.* (2003) utilizaram uma associação de misoprostol e sulfato de terbutalina para promover dilatação cervical no momento da IA. A associação farmacológica foi testada primeiramente *in vitro*, avaliando a motilidade e vigor dos espermatozóides, sendo de efeito inócuo sobre a porcentagem de vivos e móveis. As taxas de fecundação (46,15% e o controle 65%). Destacando-se que os autores observaram uma tendência à significância ($P=0,08$) na taxa de prenhez do grupo controle em relação ao grupo tratado.

De acordo com Salamon e Maxwell (1995) as reduzidas taxas de fertilidade obtidas com a IA cervical com sêmen congelado são atribuídas aos danos que ocorrem nos espermatozóides durante o processo de congelamento e descongelamento, tendo como resultado o comprometimento do transporte e da viabilidade espermática.

Atualmente para incrementar ganhos genéticos é aconselhável o emprego da IA, com sêmen congelado. A disponibilidade de um procedimento eficaz de IA que utilize o sêmen congelado é a chave que proporcionará a difusão da técnica nos programas de produção animal (DONOVAN *et al.*, 2004). O local de deposição do sêmen congelado é diretamente proporcional à taxa de fecundação. Assim, quando se utiliza sêmen congelado uma maior taxa de fecundação é obtida com a IA por laparoscopia, em relação a IA transcervical (WULSTER-RADCLIFFE e LEWIS, 2002; WULSTER-RADCLIFFE, WANG e LEWIS, 2004) ou cervical (KING *et al.*, 2004).

A IA por laparoscopia foi utilizada primeiramente por Killen e Caffery (1982). O uso do laparoscópio tornou viável a utilização do sêmen congelado, proporcionando a obtenção de taxas de prenhez satisfatórias ($\pm 60\%$). Ghalsasi e Nimbkar (1996) concluíram que a técnica de IA intra-uterina por laparoscopia pode ser utilizada com eficácia na espécie ovina. Em diferentes circunstâncias em que pode variar a época do ano, o método de sincronização do estro e a preparação do sêmen, constituindo-se esta técnica de IA em uma ferramenta eficaz para a disseminação de material genético superior. A IA por laparoscopia com sêmen fresco ou congelado é efetuada como rotina comercial em grandes rebanhos ovinos na Austrália. As técnicas atuais recomendam inseminar a metade da dose total na região média de cada corno uterino durante o procedimento de laparoscopia (EVANS e MAXWELL, 1987). Este procedimento tem por base as observações de Killen e Caffery (1982), que relataram uma maior taxa de prenhez para as ovelhas inseminadas em ambos os cornos uterinos em comparação com aquelas inseminadas em apenas em um corno. Por outro lado, Perkins, Hill e Pedrana (1996) usaram uma técnica modificada de IA por laparoscopia, onde depositavam, após a visualização da cavidade abdominal, a dose total inseminante no corno uterino mais acessível à manipulação. As IA foram executadas sob circunstâncias comerciais por um operador experiente, sendo que a IA em um corno uterino não se diferenciou

estatisticamente da IA nos dois cornos uterinos. Os autores relatam que a dupla IA no mesmo corno uterino aumenta a probabilidade do ápice da agulha ser colocado de forma correta no lúmen do corno uterino, para a adequada deposição dos espermatozóides.

Outra variável de fundamental importância para o sucesso da IA em ovinos é o momento em que o procedimento é realizado. Considerando-se a técnica escolhida (transcervical ou laparoscopia), a diluição e o tipo de conservação do sêmen pode-se determinar o melhor momento para proceder-se a IA das fêmeas. McKusick *et al.* (1998) compararam as taxas de nascimentos de cordeiros obtidas com a utilização da IA transcervical descrita por pesquisadores canadenses (HALBERT *et al.*, 1990) com a laparoscopia, utilizando sêmen congelado em dois intervalos de tempo entre a retirada da progesterona e a IA (50-52 e 53-56 horas). O ejaculado foi diluído de maneira que permitisse a crioconservação de doses com aproximadamente 110×10^6 sptz vivos e a realização da IA com 65×10^6 sptz vivos após o descongelamento do sêmen. Os resultados obtidos na comparação da IA transcervical e laparoscópica, apresentaram diferença significativa, 20,7% (8/47) versus 43,9% (33/74) respectivamente. A avaliação dos diferentes intervalos de tempo, revelou diferença significativa, 22,0% (13/50) de partos nas IA realizadas entre 50-52 horas e 42,7% (24/63) de partos no intervalo das 53-56 horas. Os autores concluíram que a utilização da IA por laparoscopia na avaliação das taxas de nascimento de cordeiros foi superior à obtida com a IA transcervical. O intervalo de 53 a 56 horas após a retirada da progesterona para realização das IAs foi mais eficiente.

2.2 Capacitação espermática

Em meados do século XX Chang (1951) e Austin (1951) relataram a necessidade do espermatozóide ejaculado passar por transformações fisiológicas no trato genital feminino, que lhe conferiam a habilidade de fecundar o óvulo. Este processo de modificações ficou conhecido como capacitação espermática. Em termos gerais as etapas da capacitação são as seguintes: alteração da motilidade espermática, fixação à zona pelúcida, e a

realização da reação acrossomal que caracteriza-se pela excitose do conteúdo acrossomal (YANAGIMACHI, 1994).

Os espermatozoides são impedidos de realizarem a capacitação pelas secreções epididimárias e das glândulas anexas, durante o trajeto nas vias genitais masculinas até o momento da ejaculação. *In vivo* estas secreções são eliminadas pelo trânsito dos espermatozoides através das vias genitais femininas. A cérvix funciona como um filtro nas espécies de ejaculação vaginal, como nos ruminantes, ou por mecanismos de reabsorção nas espécies de ejaculação intra-uterina, como nos eqüinos, suínos e caninos. *In vitro* pode-se obter a eliminação do plasma seminal por centrifugação ou pela migração ascendente (*swim-up*) dos espermatozoides (THIBault, 2001).

As alterações espermáticas que caracterizam a capacitação ocorrem somente no útero e salpínges, os espermatozoides depositados na cavidade peritoneal não conseguem alcançar a capacitação. Três processos bioquímicos são responsáveis pelas modificações espermáticas: 1) a retirada das proteínas presentes na membrana plasmática do espermatozoide pelos glicosaminoglicanos, que estão presentes nas secreções das vias genitais femininas; 2) retirada do colesterol livre pela albumina e pela lipoproteína HDL e 3) reorganização das cadeias oligosacarídicas das proteínas internas da membrana plasmática, que permitem o influxo de Ca^{+2} . Estas alterações das membranas possibilitam ao espermatozoide, através de receptores específicos a fixação à proteína ZP3 da zona pelúcida (ZP). Ao mesmo tempo aumenta a permeabilidade ao Ca^{+2} , facilitando mais ainda o movimento das proteínas contidas nas membranas espermáticas. Neste período o espermatozoide torna-se hiperativo, perdendo praticamente o movimento progressivo em favor do movimento circular. A cascata de eventos que induz a hiperatividade espermática pode ser caracterizada pelas seguintes etapas: perda de colesterol, influxo de Ca^{+2} , elevação do AMPc e a fosforilação das proteínas do flagelo espermático. Após passar por estas modificações o espermatozoide está apto a fixar-se à zona pelúcida através da enzima galactosil-transferase (Gal-T), que se liga à cadeia oligossacarídica da ZP3. Neste momento o espermatozoide encontra-se preparado para realizar a reação acrossômica (RA), que com a estimulação de um receptor espermático da ZP3 ainda hoje não caracterizado, desencadeia a excitose do conteúdo acrossômico,

caracterizando a RA. Após a ocorrência da RA o espermatozóide realiza uma segunda fixação à zona pelúcida, desta feita à ZP2, que proporciona estabilidade na união do espermatozóide desprovido da membrana acrossômica com a zona pelúcida (BREITBART, 2002).

De acordo com Breitbart, Rubinstein e Lax (1997) a presença de concentrações micromolares de espermina estimula a RA, o que é inibido pela presença de concentrações milimolares. A espermina é um constituinte fisiológico do plasma seminal que regula a exocitose acrossomal através da modulação do Ca^{+2} intracelular e da atividade fosfolipase C. A espermina liga-se aos espermatozoides através de ligações eletrostáticas (RUBINSTEIN e BREITBART, 1991). Espécies que possuem concentrações milimolares de espermina no plasma seminal incorporam rapidamente estas substâncias aos espermatozoides decorrentes a ejaculação inibindo temporariamente a capacitação espermática. A redução da concentração de esperminas durante o trânsito dos espermatozoides no trato genital feminino aliado a presença de heparina, faz com que de forma progressiva ocorram os fenômenos de capacitação espermática (PARRISH *et al.*, 1988)

Nos mamíferos a passagem do espermatozóide através da ZP deixa um rastro oblíquo, de fácil identificação pelas suas nítidas bordas, que sugere uma penetração mecânica, ao invés de uma digestão enzimática, como acontece em outros vertebrados. Após a RA uma pequena quantidade das enzimas acrossômicas permanecem ligadas à membrana interna, que podem facilitar a passagem do espermatozóide, modificando o ambiente. Provavelmente isto acontece através da ação da hialuronidase que dissocia o ácido hialurônico que ocupa as malhas moleculares da ZP e também pela ruptura das pontes ZP2-ZP3 pela ação da β - N-acetilglicosaminidase e da acrosina (LIN *et al.*, 1994).

3. ARTIGO

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR LAPAROSCOPIA EM OVINOS UTILIZANDO ESPERMATOZÓIDES DESCONGELADOS E CAPACITADOS *in vitro*.

Luiz Felipe Steigleder¹, Márcio Scherer Aguinisky², Felipe Ledur Ongaratto²,
Natália Schmidt Arruda², Daniela Scherer da Silva³, José Luiz Rodrigues⁴

RESUMO

A técnica de inseminação artificial (IA) por laparoscopia em ovinos foi utilizada pela primeira vez em 1982, o que tornou viável a utilização econômica de sêmen congelado nesta espécie. Os experimentos foram realizados com o objetivo de determinar as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por laparoscopia, utilizando 50×10^6 espermatozóides descongelados e capacitados *in vitro*. No experimento 1, foi utilizado sêmen de um reprodutor e 67 ovelhas com estros sincronizados, divididas aleatoriamente entre os grupos: sêmen congelado (SC₁) e sêmen congelado capacitado *in vitro* (SCC₁). As ovelhas foram submetidas à IA, com 50×10^6 espermatozóides, 56 e 60 horas, respectivamente, após a retirada das esponjas impregnadas com progesterona. No grupo SCC₁ a taxa de prenhez foi de 48,39% (15/31) significativamente superior ao observado no grupo SC₁ de 25% (9/36). No experimento 2, utilizou-se um reprodutor e 100 ovelhas com os estros sincronizados, distribuídas aleatoriamente entre três grupos: sêmen fresco (SF₂), SC₂ e SCC₂. Nos grupos SF₂ e SC₂ as fêmeas foram inseminadas com 100×10^6 espermatozóides e 56 horas após a retirada da progesterona. No grupo das fêmeas inseminadas com espermatozóides capacitados *in vitro* utilizou-se 50×10^6 espermatozóides e um intervalo de 60 horas após retirada da progesterona. As taxas de prenhez diagnosticadas nos diferentes grupos experimentais foram: SF₂ 60,9% (25/41), SC₂ 56,70% (17/30) e SCC₂ 44,90% (13/29), não existindo diferença estatística

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-UFRGS.

² Graduação em Medicina Veterinária –UFRGS.

³ Médica Veterinária, MSc.

⁴ PhD Professor Titular Departamento de Patologia Veterinária – FAVET-UFRGS.

entre os grupos. Os experimentos realizados mostraram a viabilidade do emprego, na espécie ovina da IA por laparoscopia utilizando 50×10^6 espermatozoides descongelados e capacitados *in vitro*.

Palavras chaves: ovino, inseminação artificial, laparoscopia, sêmen congelado, *in vitro*, capacitação.

ABSTRACT

*The ovine artificial insemination (AI) by laparoscopy was described the first time in 1982, since this time frozen semen became a tool for use under field conditions. Today one research goal is to achieve high pregnancies rates after AI using a reduced number of frozen/thawed spermatozoa per dosis. The experiments were carried out with the objective to determine the pregnancy rate of ewes inseminated by laparoscopy, using 50×10^6 thawed and *in vitro* capacited spermatozoa. In the experiment 1 was used semen of one fertile ram and 67 ewes with synchronized estrus. The females were randomly distributed among two experimental groups: inseminated with frozen semen (SC1) or frozen and *in vitro* capacited semen (SCC1). The ewes were submitted to the AI with 50×10^6 spermatozoa, 56 (SC1) or 60 (SCC1) hours, respectively, after retreat of the intra vaginal device impregnated with progesterona. In the group SCC1 the pregnancy rate was 48,39% (15/31) significantly different from the 25% (9/36) observed in the group SC1. In the experiment 2 was used one fertile ram and 100 ewes with synchronized estrus, distributed randomly among three groups: inseminated with fresh semen (SF2), 100×10^6 spermatozoa, SC2, 100×10^6 frozen spermatozoa and SCC2, 50×10^6 frozen and *in vitro* capacited spermatozoa. The moment of the laparoscopic AI was the same as used in the experiment 1: 56 (SF2 and SC2) or 60 (SCC2) hours, respectively, after retreat of the intra vaginal device impregnated with progesterona. The observed pregnancy rates were similar among the experimental groups: SF2 60,9% (25/41), SC2 56,70% (17/30) and SCC2 44,90% (13/29). Our experiments showed the ability of frozen/thawed and *in vitro* capacited ovine spermatozoa to *in vivo* fertilize and promote the development of pregnancies. In conclusion, it*

is possible to use 50×10^6 frozen/thawed and in vitro capacited spermatozoa for ovine laparoscopic AI.

Keywords: ovine, artificial insemination, laparoscopy, frozen semen, in vitro, capacitation.

INTRODUÇÃO

A IA em ovinos encontrou alternativas para o emprego do sêmen congelado, através da utilização da laparoscopia com a deposição direta dos espermatozoides no corno uterino (KILLEN e CAFFERY, 1982). A principal barreira transposta com o auxílio da laparoscopia foi a anatomia da cérvix, que na espécie ovina impede a deposição eficiente dos espermatozoides na cavidade uterina (NAQVI *et al.*, 2005). Lamentavelmente ao contrário da vaca e da cabra, a cérvix da ovelha representa uma barreira, que impede à utilização em larga escala da inseminação intrauterina via transcervical. Isto não se deve somente ao tamanho físico do canal e de um diâmetro estreito do lúmen (mesmo no estro), mas devido também à existência de uma série excêntrica de quatro a oito anéis em forma de funil (NAQVI *et al.*, 2005). Outro problema resolvido com o auxílio da laparoscopia foi a falha no transporte espermático, que ocasiona a perda dos espermatozoides durante o trajeto no trato genital feminino até o local da fecundação (HAWK e CONLEY, 1975).

O desenvolvimento das técnicas de produção *in vitro* de embriões em diferentes espécies mamíferas permitiu que procedimentos adequados para a indução da capacitação espermática fossem descritos e utilizados com eficiência nos modelos *in vitro* (BAVISTER, 2002). De acordo com Salamon e Maxwell (1995), levando-se em consideração as características do ejaculado ovino, a exigência de doses inseminantes com elevada concentração ainda é hoje um dos fatores limitantes para uma efetiva multiplicação do potencial reprodutivo de carneiros considerados alto valor zootécnico.

A busca por procedimentos que viabilizem a redução da concentração espermática da dose inseminante, com a manutenção de taxas de prenhez economicamente viáveis, é atualmente um dos desafios que aguardam as

respostas da pesquisa científica. Uma alternativa ainda não testada na procura da redução do número de espermatozóides é a associação do momento da IA por laparoscopia com o emprego de espermatozóides descongelados e capacitados *in vitro*. Os experimentos realizados tiveram por objetivo determinar as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por laparoscopia com 50×10^6 espermatozóides descongelados e capacitados *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Nos experimentos foram utilizados dois reprodutores com idades de 5 anos da raça Lacaune Lait, aptos à reprodução (anexos 1 e 2). As fêmeas utilizadas no experimento 1 eram sem raça definida (SRD), com idades entre 2 à 6 anos e peso de 55 ± 10 Kg. No experimento 2, os animais eram meio sangue Lacaune Lait, com peso de 50 ± 15 Kg e idades entre 2 a 5 anos.

Coleta e Processamento do Sêmen

Após a coleta do sêmen com auxílio da vagina artificial, os espermatozóides foram avaliados quanto a motilidade e vigor, sendo descartados os ejaculados que apresentavam motilidade inferior a 80% e vigor menor que 3 (escala 1 a 5). O diluidor utilizado, a base de TRIS -gema e glicerol, foi preparado conforme descreveram Salamon e Lightfoot (1967), sendo feita uma primeira diluição na proporção de 1:1 (v/v), a 30°C. Depois de realizada a determinação da concentração espermática a suspensão foi diluída em duas concentrações; 100×10^6 e 50×10^6 espermatozóides/ 0,25mL. O sêmen diluído foi colocado a 4°C, por um período de resfriamento de 2 horas e 30 minutos, e o tempo de estabilização de 30 minutos a 4°C. Passado o tempo, o

sêmen foi acondicionado em palhetas de 0,25mL IMV⁵ devidamente identificadas. A congelação das amostras foi realizada em vapor de nitrogênio líquido a uma temperatura de -80°C, medida com o auxílio de um termômetro, por um período de 8 minutos, finalizado o processo, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e acondicionadas em um botijão criogênico.

Sincronização do Estro

As ovelhas foram sincronizadas utilizando um dispositivo intravaginal (esponja) impregnado com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona⁶ (MAP). Os dispositivos permaneciam nas ovelhas por 14 dias e no dia da retirada das esponjas os animais foram tratados com 385UI de gonadotrofina coriônica eqüina⁷ (eCG) por via intramuscular.

Capacitação *in vitro*

A palheta com o sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo imediatamente avaliados a motilidade e o vigor da amostra. Os espermatozóides foram separados pela técnica de migração ascendente (*swim-up*) modificada descrita por Parrish e Foote (1987). O conteúdo da palheta foi esvaziado no fundo de um tubo cônico Falcon de 15mL que já continha 1mL de Sperm-TALP modificado (anexo 3) previamente aquecido em banho-maria à 37°C e mantido nesta temperatura por 1 hora. Após este período retirou-se 850µL do sobrenadante, que foi transferido para outro tubo cônico, que foi submetido à centrifugação por 10 minutos à 1700 rpm. Ao final da centrifugação o pellet foi transferido para um eppendorf que continha 100µL de meio Fert-TALP modificado (anexo 4). Esta solução com os espermatozóides foi mantida em repouso por pelo menos 20 minutos até a execução das IAs.

⁵ Palhetas – França.

⁶ Genix Indústria Farmacêutica LTDA.

⁷ Folligon®, Intervet International B.V – Holanda.

Determinação da Capacitação *in vitro*

Para avaliar a capacitação espermática *in vitro* foi utilizada a técnica da clortetraciclina (CTC), descrita por Pérez *et al.* (1996) modificada (anexo 5). Em cada experimento utilizaram-se três palhetas de 0,25mL sendo o conteúdo de cada palheta dividido em dois grupos: sêmen congelado capacitado (SCC₁ e SCC₂) e sêmen congelado não capacitado (SCNC₁ e SCNC₂). Para cada grupo foram confeccionadas três lâminas por rotina, totalizando nove lâminas por grupo.

Os espermatozóides foram selecionados pela técnica de *swim-up* conforme descrito anteriormente. Para a determinação da capacitação foram retirados 190µL da suspensão contendo espermatozóides em meio Fert-TALP modificado (anexo 4). Adicionou-se 10µL de Hoechst a esta solução, que foi incubada a 37°C por dois minutos. Após este período adicionou-se 2mL de polivinil-pirrolidona (PVP) à suspensão, que foi submetida à centrifugação (2330 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foi adicionado a solução de CTC, sendo posteriormente confeccionadas as lâminas.

A interpretação da coloração dos espermatozóides foi realizada de acordo com a classificação descrita por Rathi *et al.* (2001) com modificações, identificando-se três estágios da capacitação espermática *in vitro*: 1) espermatozóide não capacitado: a cabeça inteira do espermatozóide aparece fluorescente e brilhante, com ou sem uma faixa equatorial mais brilhante; 2) espermatozóide capacitado com acrossoma-intacto: a região acrossomal do espermatozóide, a cabeça, apresenta fluorescência brilhante, com segmento post-acrossomal não fluorescente; 3) espermatozóides capacitados com reação do acrossoma: a região acrossomal não apresenta fluorescência e o segmento post-acrossomal é fluorescente.

Para análise da coloração, em cada lâmina foram avaliados 100 espermatozóides utilizando microscópio⁸ de epifluorescência com filtro de excitação de 458 nm.

⁸ Axiovet 135, Zeiss, Germany.

Inseminação Artificial

Os animais foram submetidos a um jejum hídrico e alimentar de 12 horas antes do início das inseminações. As ovelhas foram colocadas em decúbito dorsal e contidas em uma mesa cirúrgica em um ângulo de 45 à 60° de cabeça para baixo. Após realizou-se a antissepsia do abdômen com uma solução de álcool-iodado e incisou-se a região abdominal, aproximadamente 7cm anterior ao úbere e 5 cm lateralmente à linha média (anexo 06). A incisão de 1cm, tamanho suficiente para introduzir-se o trocater (Ø5mm), por onde é introduzida a lente do laparoscópio⁹, primeiro para verificar-se a correta posição do trocater na cavidade abdominal, livre das dobras do grande omento. Imediatamente após se insuflou dióxido de carbono (CO₂), com a finalidade de distender a cavidade abdominal para criar um espaço adequado à manipulação dos cornos uterinos requerida pela IA. Em seguida uma segunda incisão foi realizada em situação paralela a primeira, para permitir a colocação de outro trocater, que proporciona acesso ao aplicador contendo a dose inseminante. A IA propriamente dita foi realizada com o auxílio do aplicador¹⁰ depositando-se a 125 µL, metade da dose, na região média de cada corno uterino.

Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IA, com auxílio de um aparelho de ultrasonografia¹¹ equipado com um transdutor linear de 5 MHz.

Análise Estatística

As taxas de capacitação espermática foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado, utilizando-se a tabela de contingência com nível de significância de 0,1%. Os dados relativos às prenhez obtidas foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado, utilizando-se a tabela de contingência com nível de significância de 5%.

Experimento 1

⁹ Hopkins 30°, Storz, Germany.

¹⁰ ASPIC®,IMV, France

¹¹ Pie Medical, Scanner 480.

Neste experimento foi utilizado o sêmen de um reprodutor e 67 ovelhas divididas de forma aleatória entre os dois grupos: sêmen congelado (SC₁) e sêmen congelado capacitado (SCC₁). O tempo entre a retirada da progesterona, aplicação do eCG e a inseminação foi de 56 no grupo SC₁ e 60 horas no grupo SCC₁.

Experimento 2

Utilizou-se um reprodutor e 100 ovelhas, distribuídas aleatoriamente entre três grupos: grupo sêmen fresco (SF₂), grupo sêmen congelado (SC₂) e grupo sêmen congelado capacitado (SCC₂). Nos grupos SF₂ e SC₂ as fêmeas foram inseminadas com 100x10⁶ espermatozóides 56 horas após a retirada da progesterona. No grupo das fêmeas inseminadas com espermatozóides capacitados *in vitro* utilizou-se 50x10⁶ espermatozóides e um intervalo de 60 horas após a retirada da progesterona.

RESULTADOS

Experimento 1

A Tabela 1 contém os dados da avaliação de 900 espermatozóides em cada grupo, em três repetições, sendo estes classificados em: não capacitado, capacitado com acrossoma intacto e capacitado com reação acrossomal. Os resultados mostraram que no grupo SCNC₁ onde os espermatozóides não foram submetidos a capacitação, somente 4,5% dos espermatozóides estavam capacitados no momento da IA. Por outro lado no grupo SCC₁, após a indução da capacitação *in vitro*, 86,8% dos espermatozóides foram identificados como capacitados e destes 47% haviam realizado a RA até o momento da IA.

Tabela 1. Determinação da capacitação espermática (experimento 1).

Grupos	SPTZ N	Não capacitado		Capacitado			
				com acrossoma intacto		com reação acrossomal	
				N	%	N	%
SCNC ₁	900	860 ^a	95,5	15 ^a	1,7	25 ^a	2,8
SCC ₁	900	119 ^b	13,2	358 ^b	39,8	423 ^b	47,0

Letras diferentes na coluna representam diferença significativa (P<0,001).

A Tabela 2 revela que se utilizando uma dose inseminante de 50×10^6 , a IA com espermatozoides capacitados *in vitro* foi mais eficiente levando-se em consideração o número de prenheses, 48,39% (15/31) comparado aos 25% (9/36) de prenhez observado no grupo inseminado com espermatozoides não capacitados.

Tabela 2. Taxa de prenhez de ovelhas com estro sincronizado e inseminadas com sêmen descongelado e capacitado *in vitro* (experimento 1).

Grupos	Concentração espermática/dose inseminante	Ovelhas		
		N	Prenhez	
			N	%
SC ₁	50×10^6	36	9 ^a	25,00
SCC ₁	50×10^6	31	15 ^b	48,39

Letras diferentes na coluna representam diferença significativa (P<0,05).

Experimento 2

Os resultados da Tabela 3 corroboraram as observações do experimento 1. No grupo SCNC₂ apenas 4,1% dos espermatozoides estavam capacitados no momento da IA, ao contrário dos 88,6% capacitados, com 45% de reação acrossômica observados no grupo SCC₂.

Tabela 3. Taxa de capacitação espermática (experimento 2).

Grupos	SPTZ N	Não capacitado		Capacitado			
				com acrossoma intacto		com reação acrossomal	
				N	%	N	%
SCNC ₂	900	863 ^a	95,9	25 ^a	2,8	12 ^a	1,3

SCC ₂	900	103 ^b	11,4	392 ^b	43,6	405 ^b	45,0
------------------	-----	------------------	------	------------------	------	------------------	------

Letras diferentes na coluna representam diferença significativa (P<0,001).

A Tabela 4 mostra as taxas de prenhez obtidas com a utilização de sêmen fresco (SF₂), sêmen congelado (SC₂) e sêmen congelado com prévia capacitação *in vitro* (SCC₂), com diferentes concentrações, não havendo diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 4. Taxa de prenhez de ovelhas com estro sincronizado e inseminadas com sêmen fresco, descongelado e capacitado *in vitro* (experimento 2).

Grupos	Concentração espermática/dose inseminante	Ovelhas		
		N	Prenhez	
			N	%
SF ₂	100 x 10 ⁶	41	25	60,90
SC ₂	100 x 10 ⁶	30	17	56,70
SCC ₂	50 x 10 ⁶	29	13	44,90

Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P≥0,05).

DISCUSSÃO

Compreender como o espermatozóide fecunda o óvulo e o zigoto inicia o desenvolvimento tem sido um permanente desafio para os especialistas em reprodução animal. Apesar do grande número de espermatozóides liberados na ejaculação, apenas um reduzido número alcança o infundíbulo, região do salpíngue onde ocorre a fecundação (Suarez *et al.*, 1990). Na espécie ovina a anatomia cervical é a maior barreira para a deposição uterina dos espermatozóides nos procedimentos de IA. Salamon e Lightfoot (1967) reportaram na espécie ovina os primeiros nascimentos obtidos através da IA com sêmen congelado. Passados 50 anos deste marco, ainda hoje, a congelação do sêmen ovino não é eficiente para utilização econômica em larga escala. As características do sêmen ovino, aliadas à anatomia cervical, transformaram em grande desafio científico a busca da solução para o emprego eficiente do sêmen crioconservado. A disseminação da utilização da IA por laparoscopia (Maxwell e Watson, 1996), permite hoje que um número

significativo de fêmeas possa ser inseminado com o sêmen de reprodutores selecionados. A nossa proposta experimental teve como objetivo testar a viabilidade pós IA do sêmen descongelado submetido à capacitação *in vitro*. A perspectiva deste procedimento nos permite afirmar que a redução do número de espermatozóides necessários à IA proporcionará um aumento significativo no número de doses inseminantes de carneiros considerados excepcionais.

O primeiro passo para obter-se uma adequada amostra de sêmen para indução da capacitação *in vitro* é a escolha do procedimento, que será empregado para a separação dos espermatozóides viáveis após o descongelamento. A literatura destaca duas técnicas de maior utilização na separação espermática, o gradiente de percoll e a migração ascendente (*swim-up*) (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995) A separação espermática com auxílio do *swim-up* foi utilizada nos experimentos por permitir uma seleção adequada dos espermatozóides aptos a realizarem a capacitação e a fecundação *in vitro*, como já comprovaram Grasa *et al.* (2004) e Batista *et al.* (2006).

Desde a publicação de Parrish *et al.* (1986), nos últimos trinta anos vários autores reportaram dados sobre diferentes procedimentos para induzir a capacitação espermática. Sabe-se que para a ocorrência da capacitação espermática *in vitro* é necessária a manipulação do sêmen (MAXWELL e WATSON, 1996) ou a sua exposição a substâncias indutoras, como por exemplo, a heparina, cafeína e cálcio ionóforo (A23187) (GRASA, CEBRIÁN-PÉREZ e MUIÑO-BLANCO, 2006). Levando-se em consideração as semelhanças de algumas das características seminais existentes entre as diferentes espécies ruminantes e, principalmente, pela experiência na rotina da fecundação de oócitos bovinos (OLIVEIRA, LOPES e RODRIGUES, 2005; OLIVEIRA, LOPES e RODRIGUES, 2006; VIEIRA *et al.* 2006) optamos por induzir a capacitação dos espermatozóides ovinos utilizando 5,76 µg/mL de heparina, 1,1 µg/mL hipotaurina e 0,183 µg/mL de epinefrina diluídos em Fert-talp modificado (PARRISH e FOOTE, 1987). O percentual de 87% dos espermatozóides ovinos capacitados *in vitro* observados nos experimentos (Tabelas 1 e 3), foi caracterizado como adequado para o emprego nas IAs por laparoscopia das fêmeas com estros sincronizados, no período peri-ovulatório, 60 horas após a retirada da progesterona. A identificação dos espermatozóides

capacitados, com ou sem reação acrossomal, foi realizada com o auxílio da técnica da clortetraciclina descrita por Pérez *et al.* (1996) e de las Heras, Valcarcel e Perez, (1997). A interpretação dos dados obtidos (anexo 07) foi facilitada pelos critérios empregados por Rathi *et al.* (2001), que examinaram e descreveram na espécie eqüina de forma didática as modificações de coloração das estruturas espermáticas. Os dados experimentais produzidos de três replicações com a contagem de 900 espermatozoides por grupo experimental, permitiu a verificação de uma taxa de capacitação constante tanto dos espermatozoides dos grupos controles (4,5%) como naqueles em que esta foi induzida (87%).

Gillan e Maxwell (1999) revisaram a integridade funcional dos espermatozoides no trato reprodutivo das ovelhas e relataram que os espermatozoides congelados são liberados mais cedo do que espermatozoides frescos após encontrarem-se alojados no oviduto. Esta observação parece confirmar uma precoce capacitação dos espermatozoides crioconservados em relação aos frescos. Portanto, aqueles estariam aptos para fecundar, enquanto os frescos ainda necessitariam de tempo no oviduto para alcançarem esta capacidade. Desta forma, seria necessário que a IA por laparoscopia fosse realizada em diferentes tempos após a retirada da progesterona e aplicação do eCG, dependendo da forma de conservação e do preparo dos espermatozoides da dose inseminante. O momento da IA é de fundamental importância para o sucesso da utilização desta biotécnica de reprodução na espécie ovina. Menchaca e Rubianes (2004) relatam que a ovulação de ovelhas com estro sincronizado ocorre em média 60 horas após a retirada da progesterona e aplicação do eCG. As IAs das fêmeas dos grupos SC₁, SF₂, SC₂ foram procedidas após transcorridas 56 horas da retirada da progesterona e aplicação do eCG, em período pré-ovulatório, pela necessidade dos espermatozoides realizarem a capacitação *in vivo*. Os resultados de prenhez obtidos (Tabela 4) contrariam a argumentação de Gillan e Maxwell (1999), que afirmaram ser necessários intervalos de tempo diferenciados entre a retirada da progesterona e a IA quando utiliza-se sêmen fresco ou congelado.

O sêmen fresco e o sêmen congelado utilizados nas IAs do segundo experimento proporcionaram um número semelhante de prenheses. Por outro lado já nos grupos SCC₁ e o SCC₂ o intervalo entre a retirada da progesterona,

aplicação do eCG e a IA das fêmeas foi de 60 horas, procurando-se o momento mais próximo da ovulação, se possível logo após a ocorrência da mesma, devido ao fato dos espermatozóides já estarem previamente capacitados. McKusick *et al.* (1998) examinando a influência do momento da IA, observaram resultados mais eficientes (42,7% versus 22,0%) quando as fêmeas foram inseminadas com um intervalo de 53 a 56 horas após a retirada da progesterona em relação ao intervalo de 50 a 52 horas. No caso do nosso experimento os resultados acima ratificam a IA realizada às 56 horas no grupo dos espermatozóides não capacitados e, também permitiram a escolha das 60 horas após a retirada da progesterona, como um intervalo de tempo mais adequado para proceder-se a IA com espermatozóides previamente capacitados, que teoricamente teriam uma menor sobrevida no trato genital feminino.

A concentração da dose inseminante é outra variável importante na análise dos resultados obtidos. No primeiro experimento estabelecemos a dose de 50×10^6 spz por representar uma reduzida concentração espermática quando leva-se em consideração a utilização de sêmen congelado na espécie ovina (EVANS e MAXWELL 1987). Os autores recomendaram como limite mínimo a concentração de 20×10^6 spz viáveis na dose inseminante, para que taxas máximas de fertilidade pudessem ser alcançadas. Sabe-se que ao descongelamento a perda média da viabilidade espermática fica em torno dos 50%, o que nos permitiu uma margem de garantia de mais ou menos 5×10^6 spz em relação ao proposto pelos autores acima, pois a descongelação dos 50×10^6 spz proporcionou uma dose inseminante com 25×10^6 spz viáveis. O anexo 08 mostra taxas de fecundação obtidas em diferentes experimentos e com diferentes concentrações espermáticas. Deve-se ressaltar as taxas de prenhez obtidas no experimento 1 revelaram uma maior habilidade (48,39% - 15/31) dos espermatozóides previamente capacitados em fecundar os oócitos em relação aos não capacitados (25% - 9/36). Esta observação nos permitiu desenhar o experimento 2 em que as taxas de prenhez observadas na IA com espermatozóides capacitados foi comparada aos resultados de fertilidade obtidos com doses inseminantes recomendadas para a rotina da IA por laparoscopia. A análise dos dados de prenhez da tabela 4 mostra de forma cristalina que tanto a IA uterina com auxílio do laparoscópio com 100×10^6 spz

frescos (60,90% - 25/41), como com 100×10^6 congelados (56,70% - 17/30) sptz, proporcionaram taxas de prenhez semelhantes às obtidas com 50×10^6 sptz (44,90% 13/29) crioconservados e previamente capacitados *in vitro*. Os espermatozoides previamente capacitados comprovaram a sua viabilidade através da habilidade em fecundar os oócitos com a mesma eficiência que o obtido nos outros grupos experimentais, onde foram empregadas concentrações espermáticas recomendadas comercialmente para a rotina de programas de IA por laparoscopia. Esta observação contraria o argumento que a indução da capacitação precoce seria deletérea à viabilidade dos espermatozoides reduzindo o período de tempo que estaria apto à fecundar o oócito. A literatura consultada não contempla observações sobre a fertilidade de espermatozoides previamente capacitados empregados na IA por laparoscopia na espécie ovina.

CONCLUSÃO

As taxas de prenhez obtidas nos experimentos realizados mostraram a viabilidade do emprego na espécie ovina da IA por laparoscopia utilizando 50×10^6 espermatozoides descongelados e capacitados *in vitro*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Levando-se em consideração as limitações do uso de sêmen congelado na IA na espécie ovina, torna-se necessária a implementação de novas técnicas que viabilizem a utilização de doses com concentrações espermáticas reduzidas. Neste sentido, a capacitação espermática *in vitro* a partir de sêmen congelado tem se mostrado como alternativa viável para a obtenção de taxas de prenhez satisfatórias. Faz-se necessário a realização de novas pesquisas sobre o assunto na busca de um melhor entendimento sobre a utilização de espermatozóides capacitados *in vitro*.

Para futuros experimentos é interessante testar a utilização de espermatozóides descongelados capacitados *in vitro*, com reduzidas concentrações espermáticas, menores que a utilizada neste experimento, como por exemplo: 5, 10 e 20×10^6 spz por dose inseminante na IA intra-uterina por laparoscopia. Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de realizar a deposição dos espermatozóides capacitados próximo ao oviduto, diferente do que é utilizado nas rotinas de IA por laparoscopia, nas quais a deposição dos espermatozóides ocorre no terço médio de cada corno uterino, desta forma diminuindo o trajeto a ser percorrido pelos espermatozóides no trato reprodutivo das ovelhas. Por outro lado, para realmente tornar possível o uso de reduzidas concentrações espermáticas é de fundamental importância estimar o momento da ovulação. É necessário testar diferentes períodos de tempo entre a retirada da progesterona e aplicação do eCG e o momento da IA, como por exemplo, 60, 64 e 68 horas.

A IA por laparoscopia de ovelhas submetidas à superovulação é outra possibilidade do emprego de espermatozóides previamente capacitados. Este procedimento poderá contribuir para que as barreiras de transporte e da capacitação espermática possam ser removidas de forma definitiva.

O esclarecimento dos fenômenos reprodutivos da espécie ovina ainda é um desafio para os fisiologistas da reprodução. Experimentos que procurem elucidar a relação do espermatozóide com o oócito devem ter estimulada sua realização, proporcionando não só a busca do conhecimento, mas também, a formação de recursos humanos especializados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Scientific Research**, v. 4, p. 581-596, 1951.

BARBAS, J.P. *et al.* Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix (misoprostol e sulfato de terbutalina) sobre os resultados da IA em raças ovinas locais. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p.185-188, 2003.

BATISTA, M. *et al.* Effect of ram sperm capacitation by swim-up or percoll on in vitro fertilization. **Reproduction in Domestic Animal**, v.41, (4), p.342-342, 2006. (Abstract).

BAVISTER, B.D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**, v.124, p. 181-196, 2002.

BERNARDI, M.L. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 1-16, 2005.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.120-126, 2003.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; LAX, Y. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 165–174, 1997.

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

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, London, v. 168, p. 697-698, 1951.

COLAS, G. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. **Livestock Production Science**, v. 6. p. 153-166, 1979.

COLAS, G.; COUROT, M. Storage of ram semen. In: TOMAS, G. J., ROBERTSON, D. E., LIGHTFOOT, R. J. *Sheep breeding*. 2 ed., London: **Butterworths**, p. 521-532, 1976.

de las HERAS, M.; VALCARCEL, A.; PEREZ, L. In vitro capacitating effect of Gamma-aminobutyric Acid in ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 964-968, 1997.

DONOVAN, A. *et al.* Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.359-368, 2004.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. **Butterworths**, Sydney, p.158-159, 1987.

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

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.271-283, 1999.

GRASA, P. *et al.* Ram sperm selection by a Dextran/Swim-Up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. **Journal of Andrology**, v. 25, p.982-990, 2004.

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

HALBERT, G.W. *et al.* A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, p. 993-1010, 1990.

HAWK, H.W.; CONLEY, H.H. Involvement of the cervix in sperm transport failures in the reproductive tract of the ewe. **Biology of Reproduction**, v.13, p. 322-328, 1975.

KERSHAW, C.M. *et al.* The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225-1235, 2005.

KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p.95, 1982.

KING, M.E. *et al.* Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, v.62, p.1236-1244, 2004.

LIN, Y. *et al.* A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. **Journal Cell Biology**, v.125, p.1157-1163, 1994.

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

McKUSICK, B.C. *et al.* A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of wewes. In: ANNUAL SPOONER SHEEP DAY, 46, Madison, 1998. **Proceedings...** Madison; University of Wisconsin, p.69-76. 1998.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.403-413, 2004.

MILCZEWSKI, V. *et al.* Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p. 35-39, 2000.

NAQVI, S.M.K. *et al.* Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, , v. 85, p. 337-344, 2005.

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations., **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p. 129–136, 2006.

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 1559–1572, 2005.

PARRISH, J.J. *et al.* Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986.

PARRISH, J.J.; FOOTE, R.H. Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. **Journal of Andrology**, v.8, p.259-266, 1987.

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.

PARRISH, J.J. *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p. 1171-1180, 1988.

PÉREZ, L.J. *et al.* *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v.45, p.1037-1046, 1996.

PERKINS, N.R.; HILL, J.R.; PEDRANA, R.G. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. **Theriogenology**, v. 46, p. 541-545, 1996.

RATHI, R. *et al.* Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 462-470, 2001.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v.15, p.177-187, 1987.

RODRIGUES, F. *et al.* Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with aloe vera gel. **Theriogenology**, v.30, p.843-854, 1988.

RUBINSTEIN, S; BREITBART, H. Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biochemical Journal**, v. 278, p. 25-28, 1991.

SALAMON, S.; LIGHTFOOT, R.J. Fertilization and embryonic loss in sheep after insemination with deep frozen semen. **Nature**, v. 216, p. 194-195, 1967.

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**, v.38, p.1-36, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C.; FIRTH, J.H. Fertility of ram semen after storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v.2, p.373-385, 1979.

SUAREZ, S. *et al.* Sperm motility in the oviduct. In: BAVISTER, B.D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E.R.S. (Editors). **Fertilization in mammals**. Serono Symposia, Norwell, p. 111-124, 1990.

THIBAULT, C. La fécondation. In: Thibault, C.; Levasseur, M.C. (Editors). **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Coédition INRA-Ellipse, Paris, p. 367-389, 2001.

VIEIRA, A.D. *et al.* Bovine in vitro embryo production protocol: does it really influence embryo cryotolerance? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 57-63, 2006.

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 traversing the cervix on semen quality and fertility. **Theriogenology**, v.58. p.1361-1371, 2002.

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

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds) **The physiology of the reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

ANEXOS

ANEXO 1

CERTIFICADO DE EXAME ANDROLÓGICO N°.....20/2005

Nome: Dedo Verde 01-2/088.	Raça: Lacaune Lait.	Tatuagem: 01-2/088.
Data do Nasc: 26/08/2001.	FBB: 0000802.	Cabanha: Dedo Verde.
Proprietário: Paulo Aguinsky.	Município: Viamão	
Anamnese: Animal já foi utilizado na reprodução.	EXAME FUNCIONAL DO SÊMEN	
	Método de Coleta:.....Vagina Artificial.	
	Libido/Salto:.....Bom.	
	Volume (mL):.....1,2.	
	Aspecto:.....Cremoso.	
	Turbilhonamento (1 à 5):.....4.	
	Motilidade(%)/ Vigor (0 à5):.....80/3.	
	Concentração:.....3,9 bilhões sptz/mL.	
EXAME CLÍNICO GERAL	ESPERMOGRAMA	
Estado Nutricional (1-5):.....4.	Método:.....C. Fase.	
Arcada Dentária:.....S.A.	Defeitos Maiores	
Aprumos:.....S.A.	Formas teratológicas.....%	
Articulações:.....S.A.	Subdesenvolvido.....%	
Cascos:.....S.A.	Formas Duplas.....%	
	Defeitos de Acrossoma.....%	
	Defeito em diadema.....%	
	Cabeça piriforme.....2 %	
	Cabeça estreita base.....1 %	
	Cabeça com contorno anormal.....%	
	Cabeça pequena anormal.....1 %	
	Cabeça solta anormal.....%	
	Corkscrew defect.....%	
	Def. peça intermediária.....%	
	Gota Prot. Proximal.....2 %	
	Cauda fortemente dobrada.....%	
EXAME CLÍNICO ESPECIAL	Total de Defeitos Maiores.....6 %	
Prepúcio:.....S.A.	Defeitos Menores	
Pênis:.....S.A.	Cabeça estreita.....%	
Escroto:.....S.A.	Cabeça pequena normal.....1 %	
Perimetro Escrotal:.....33 cm.	Cabeça gigante, curta e larga.....%	
Testículos: Direito Esquerdo	Cabeça solta normal.....2 %	
- Dimensões S.A S.A	Implantação abaxial, retroaxial.....%	
- Consistência E E	Gota prot. Distal.....%	
- Mobilidade SIM SIM	Cauda simplesmente dobrada.....2 %	
- Sensibilidade NÃO NÃO	Cauda enrolada na porção terminal.....%	
- Simetria S S	Outros.....%	
Epidídimo: Direito Esquerdo	Total de Defeitos Menores.....5 %	
- Cabeça S.A S.A	Total de Formas Anormais.....11 %	
- Corpo S.A S.A		
- Cauda S.A S.A		
- Consistência E E		
- Sensibilidade NÃO NÃO		
Cordão Espermatóico S.A S.A		
Observações:	Data do Exame: 18/12/2005.	
Conclusão: O animal no momento do exame andrológico encontra-se apto à reprodução.		

ANEXO 2

CERTIFICADO DE EXAME ANDROLÓGICO N°.....21/2005

Nome: Dedo Verde 01-2/026.		Raça: Lacaune Lait.		Tatuagem: 01-2/026.	
Data do Nasc: 21/04/2001.		FBB: 0000748.		Cabanha: Dedo Verde.	
Proprietário: Paulo Aguinsky.		Município: Viamão			
Anamnese: Animal já foi utilizado na reprodução.			EXAME FUNCIONAL DO SÊMEN		
EXAME CLÍNICO GERAL			Método de Coleta:.....Vagina Artificial.		
			Libido/Salto:.....Bom.		
Estado Nutricional (1-5):.....4.			Volume (mL):.....1,0.		
			Aspecto:.....Cremoso.		
Arcada Dentária:.....S.A.			Turbilhonamento (1 à 5):.....4.		
			Motilidade(%)/ Vigor (0 à5):.....80/3.		
Aprumos:.....S.A.			Concentração:.....3,5 bilhões sptz/mL.		
			ESPERMOGRAMA		
Articulações:.....S.A.			Método:.....C. Fase.		
			Defeitos Maiores		
Cascos:.....S.A.			Formas teratológicas.....%		
			Subdesenvolvido.....%		
EXAME CLÍNICO ESPECIAL			Formas Duplas.....%		
Prepúcio:.....S.A.			Defeitos de Acrossoma.....%		
Pênis:.....S.A.			Defeito em diadema.....%		
Escroto:.....S.A.			Cabeça piriforme.....2 %		
Perimetro Escotral:.....35 cm.			Cabeça estreita base.....%		
Testículos: Direito Esquerdo			Cabeça com contorno anormal.....%		
- Dimensões S.A S.A			Cabeça pequena anormal.....%		
- Consistência E E			Cabeça solta anormal.....%		
- Mobilidade SIM SIM			Corkscrew defect.....%		
- Sensibilidade NÃO NÃO			Def. peça intermediária.....%		
- Simetria S S			Gota Prot. Proximal.....3 %		
Epidídimo: Direito Esquerdo			Cauda fortemente dobrada.....2 %		
- Cabeça S.A S.A			Total de Defeitos Maiores.....7 %		
- Corpo S.A S.A			Defeitos Menores		
- Cauda S.A S.A			Cabeça estreita.....%		
- Consistência E E			Cabeça pequena normal.....3 %		
- Sensibilidade NÃO NÃO			Cabeça gigante, curta e larga.....%		
Cordão Espermatóico S.A S.A			Cabeça solta normal.....%		
Observações:			Implantação abaxial, retroaxial.....%		
			Gota prot. Distal.....%		
			Cauda simplesmente dobrada.....1 %		
			Cauda enrolada na porção terminal.....2 %		
Conclusão: O animal no momento do exame andrológico encontra-se apto à reprodução.			Outros.....%		
			Total de Defeitos Menores.....6 %		
			Total de Formas Anormais.....13 %		
			Data do Exame: 18/12/2005.		

ANEXO 3

Sperm-TALP

	Reagente	Catálogo	mM	100 mL	50 mL
Meio Estoque	NaCl	S5886	113,93	665,8 mg	332,9 mg
	KCl	P5405	3,10	23,1 mg	11,6 mg
	NaH ₂ PO ₄	S5010	2,9	3,5 mg	1,8 mg
	CaCl ₂ .2H ₂ O	C7902	2,00	29,4 mg	14,7 mg
	MgCl ₂ .6H ₂ O	M2393	0,40	8,1 mg	4,1 mg
	Vermelho de Fenol	P5530	0,03	1,0 mg	0,5 mg
	Lactato de Sódio	L1375	21,69	308 µL	154 µL
	HEPES	H6147	20,00	476,8 mg	238,4 mg
	NaHCO ₃	S5761	2,5	21,0 mg	10,5 mg
	Gentamicina	G1264	50 µg/mL	5,0 mg	2,5 mg
	Piruvato de Sódio	P4562	1,00	11,0 mg	5,5 mg
	BSA		0,60%	6 mg/mL	

Preparo do Meio Estoque

- Pesar os componentes do meio estoque separadamente;
- Diluir um a um em Becker, deixando o NaHCO₃ por último;
- Acertar o volume do balão volumétrico;
- Deixar agitando no balão volumétrico durante 1 hora;
- Corrigir o pH em 7,36 (NaOH 1N);
- Medir a osmolaridade (280-300);
- Filtrar e armazenar a 4°C.

Para o Uso.

- Pesar 60mg de BSA em um Becker de 10mL;
- Adicionar 10mL de meio estoque (Sperm-TALP);
- Adicionar as alíquotas de gentamicina e piruvato;
- Equilibrar em Banho Maria por 1 hora.

ANEXO 4

Fert-TALP

	Reagentes	Catálogo	mM	100 ml	50 mL
Meio Estoque	NaCl	S5886	113,93	665,8 mg	332,9 mg
	KCl	P5405	3,21	23,9 mg	12,0 mg
	NaH ₂ PO ₄	S5010	2,9	3,5 mg	1,8 mg
	CaCl ₂ .2H ₂ O	C7902	2,00	29,4 mg	14,7 mg
	MgCl ₂ .6H ₂ O	M2393	0,78	15,8 mg	7,9 mg
	Lactato de Sódio	L1375	10,00	142 µL	71 µL
	Vermelho de Fenol	P5530	0,03	1,0 mg	0,5 mg
	Penicilamina	P5125	3 mg/mL	0,30 mg	0,15 mg
	NaHCO ₃	S5761	2,5	21,0 mg	10,5 mg
	HEPES	H6147	20,00	476,8 mg	238,4 mg
	Piruvato de Sódio	P4562	0,25	2,8 mg	1,4 mg
	Gentamicina	G1264	50 µg/mL	5,0 mg	2,5 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 os componentes do meio estoque separadamente;
- Diluir um a um em Becker, deixando o NaHCO₃ por último;
- Acertar o volume do balão volumétrico;
- Deixar agitando no balão volumétrico durante 1 hora;
- Corrigir o pH em 7,36 (HCl 1N);
- Medir a osmolaridade (280-300);
- Filtrar e armazenar a 4°C.

Para o Uso.

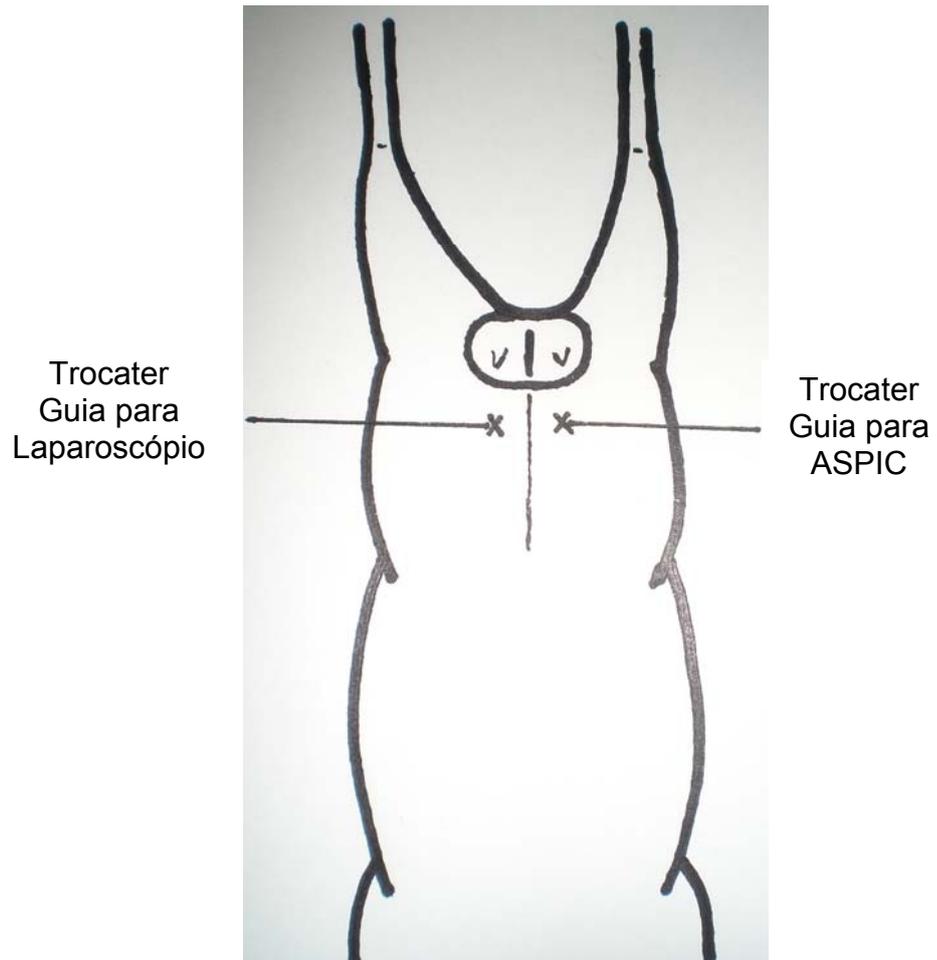
- Pesar 60mg de BSA em um Becker de 10mL;
- Adicionar 10mL de meio estoque (Fert-TALP);
- Adicionar as alíquotas de gentamicina e piruvato;
- Esperar o BSA dissolver, pode colocar em Banho Maria;
- Utilizar 2mL este meio para diluir o HHE;
- Equilibrar em Banho Maria por 1 hora.

ANEXO 5

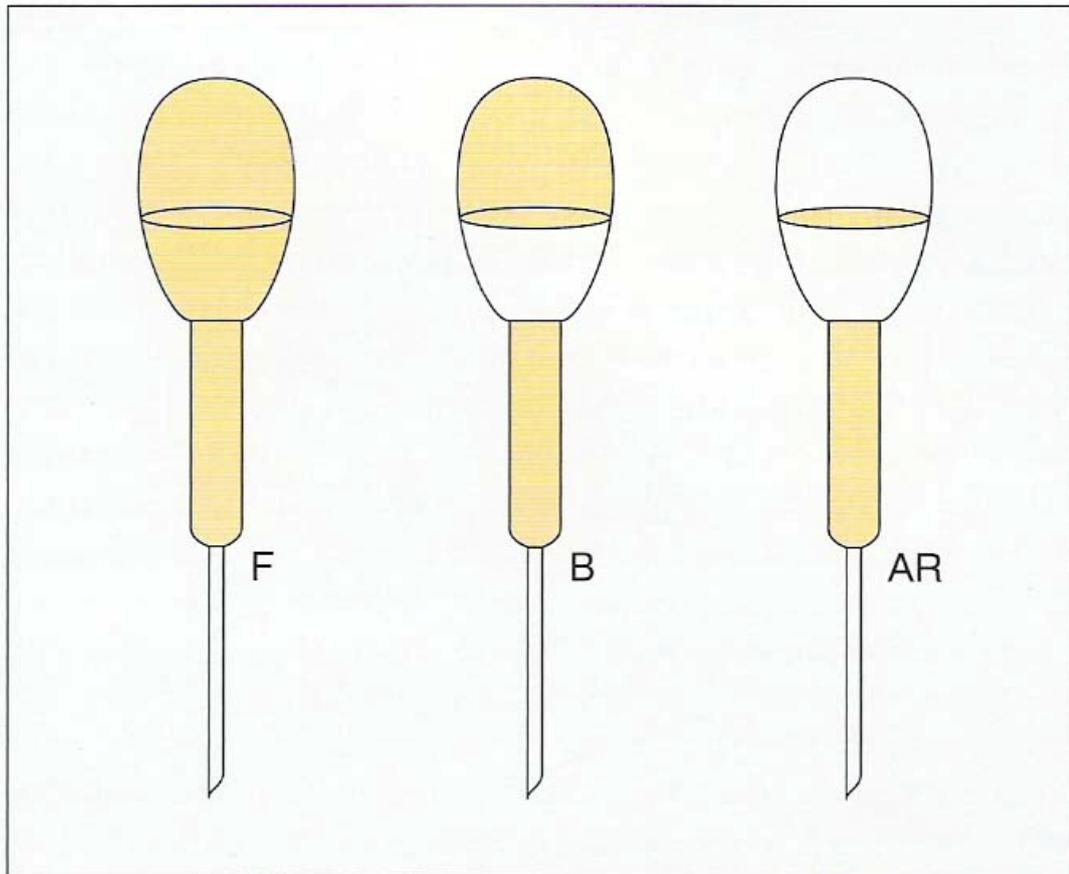
Coloração CTC + Hoechst

- 1- Aquecer 5mL da solução tampão-CTC à 37°C;
- 2- Preparar a solução de CTC (pH=7,8): diluir 2mg de ctc + 4,4mg de cisteína em 5mL de tampão ctc - (240mg de TRIS + 760mg NaCl em 100mL de água destilada. Filtrar e guardar à 4°C;
- 3- Aliquotar 45µL da solução de CTC, 10µL de hoechst, 2mL de PVP em PBS, 8 µL de PFM cada um em eppendorf e colocar na estufa à 37°C;
- 4- Fazer *Swim-up* conforme protocolo do laboratório;
- 5- Retirar 190µL da suspensão com espermatozóides e misturar com 10µL da solução de hoechst a 10µg/mL (40µg em 60mL de PBS);
- 6- Incubar por 2 minutos;
- 7- Adicionar 2mL de solução de PVP à 2% em PBS;
- 8- Centrifugar amostra à 2330rpm por 5 minutos;
- 9- Remover o sobrenadante;
- 10-Ressuspender o pellet em 45µL do meio de capacitação;
- 11-Adicionar 45µL da solução de CTC fresco, preparado no dia;
- 12-Após 20 segundos adicionar 8µL de uma solução de PFM à 12,5% em 0,5M de TRIS (pH=7,4);
- 13- Colocar uma gota de 10µL da amostra corada entre lâmina e lamínula;
- 14-Pressionar para remover o excesso;
- 15- Selar com esmalte incolor;
- 16- Ler em epifluorescência com filtro de 355-425nm na linha de excitação com emissão de fluorescência em filtro de RKP 455.

ANEXO 6

Localização Anatômica do Posicionamento dos Trocateres para IA por Laparoscopia.

ANEXO 7

Padrões de Coloração Fluorescente com Clortetraciclina.**Legenda:**

F: Espermatozóide Não Capacitado;

B: Espermatozóide Capacitado sem reação acrossômica;

AR: Espermatozóide Capacitado com reação acrossômica.

Fonte: Curry (2000).

ANEXO 8

Avaliação das taxas de fertilidade com diferentes concentrações espermáticas utilizando sêmen congelado em diferentes raças ovinas.

Concentração Espermática/ Inseminação	Raça	Fertilidade %	Autores
50x10 ⁶ sptz móveis	Merino	49	Eppleston e Roberts (1986)
50x10 ⁶ sptz móveis	Merino	60	Rival <i>et al</i> (1984)
50x10 ⁶ sptz móveis	Merino	62	Maxwell (1986)
100x10 ⁶ sptz	Suffolk	72.7	Armstrong e Evans (1984)
100x10 ⁶ sptz	Merino	56	Maxwell (1986)
100x10 ⁶ sptz	Rouge de l'ouest	71	Vallet <i>et al</i> (1992)
100x10 ⁶ sptz móveis	Merino	55	Jabbour e Evans (1991)
200x10 ⁶ sptz móveis	Belclare	75	Fair <i>et al</i> (2005)
200x10 ⁶ sptz móveis	Suffolk	58	Fair <i>et al</i> (2005)
250x10 ⁶ sptz móveis	Merino	54	Perkins; Hill e Pedrana (1996)

