

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

**EFEITOS DE DOIS DILUIDORES COMERCIAIS NA QUALIDADE  
DO SÊMEN, FERTILIDADE E REAÇÃO UTERINA PÓS-  
INSEMINAÇÃO EM OVELHAS**

**Autor:** Arthur Fischer Neto

Médico Veterinário

**Porto Alegre**

**2009**

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

**EFEITOS DE DOIS DILUIDORES COMERCIAIS NA QUALIDADE  
DO SÊMEN, FERTILIDADE E REAÇÃO UTERINA PÓS-  
INSEMINAÇÃO EM OVELHAS**

**Autor:** Arthur Fischer Neto

Médico Veterinário

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

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enefer Rosana  
Oberst

**Porto Alegre**

**2009**

Autor: Arthur Fischer Neto

**EFEITOS DE DOIS DILUIDORES COMERCIAIS NA QUALIDADE DO SÊMEN, FERTILIDADE E REAÇÃO UTERINA PÓS-INSEMINAÇÃO EM OVELHAS.**

Aprovado em:

APROVADO POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ender Rosana Oberst

Orientadora e presidente da banca

---

Prof. Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Membro da banca

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Ribeiro

Membro da banca

---

Prof. Dr. Paulo Ricardo Loss Aguiar

Membro da banca

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação, este trabalho, esta conquista, esta realização, aos meus pais, Luiz Afonso e Moema.

Vocês sempre foram, são e sempre serão:

-minha fonte maior de formação humana;

-minha fonte inesgotável de amor, carinho e solidariedade;

-meu exemplo maior de caráter, de honestidade e de conduta humana;

-meu porto seguro, mesmo com a distância física que nos separa, diariamente, por mais de 28 anos;

-minha serenidade espiritual nos momentos de aflição e angústia;

-minha inigualável e insubstituível escola no aprendizado do verdadeiro valor e da inestimável importância da família.

Obrigado pelo amor e pela amizade, mas acima de tudo, obrigado por serem meus pais.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Toda esta conquista, desde o surgimento da idéia até esta finalização, não seria possível sem o apoio e a colaboração de inúmeras pessoas. Aliás, muito mais do que simples pessoas, verdadeiros amigos e colaboradores que demonstraram todo seu afeto, sua amizade e seus espíritos de parceria para comigo ao longo deste trabalho.

Quero iniciar agradecendo a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Enefer Rosana Oberst, pessoa maravilhosa, de um coração enorme e grande conhecimento técnico, que se tornou muito mais que uma simples orientadora, se tornou uma amiga de verdade, auxiliando-me incondicionalmente em todos os momentos que necessitei.

Ao Prof. Dr. David Driemeier e ao plantonista Paulo Bandarra, pelo apoio laboratorial e pelas análises histológicas realizadas.

Ao Dr. Rodrigo Costa Mattos e ao Dr. Ricardo Macedo Gregory, pela amizade, atenção e pela prestigiosa colaboração na sugestão de idéias e nas opiniões iniciais deste trabalho.

Agradeço, de todo coração, aos funcionários do refeitório da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Fátima, Mara, Daiana, Valquíria e Valdomiro, ao “Seu Santinho” do laboratório de inseminação artificial, as funcionárias da secretaria do pós-graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Maria Colet Lorini, Jociane Oliveira da Silva e Vera Luiza M. da Rocha, pela amizade, pela atenção e pela colaboração durante toda minha permanência nesta instituição de ensino. A bibliotecária Ana Vera Finardi Rodrigues pelas orientações na formatação desta dissertação.

Especial agradecimento a todos os professores das disciplinas cursadas durante o curso de pós-graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pela amizade, pela paciência e pelos preciosos ensinamentos passados.

Nada poderia ter sido executado sem que houvesse a disponibilidade de animais para os experimentos. Por isto, meu profundo e eterno agradecimento aos Srs. Martim Marona Pons e José Sérgio Surreaux Machado, pela inestimável colaboração de ceder os animais para este trabalho.

Também gostaria de exaltar a importância de todos os funcionários da cabanha de ovinos da propriedade, Cabanha Floresta, na pessoa do cabanheiro João Luis, e todos os “campeiros” da Estância da Ordem, na pessoa do capataz Juca Tagliaferro. Sem estes parceiros de campo e suas equipes, não só este trabalho não seria possível, como

também nossa atividade profissional ao longo do ano, portanto, meus sinceros agradecimentos a todos estes amigos e companheiros.

Agradeço imensamente ao Dr. Felipe Zandonadi Brandão da UFF, pela sua inestimável amizade, pelas análises estatísticas e pela valiosa orientação “informal” desta dissertação.

Ao Dr. Jéferson Ferreira da Fonseca pela incondicional amizade, pelo apoio constante na execução dos experimentos, pelas valiosíssimas sugestões feitas no início desta caminhada e pela importantíssima orientação “informal” desta dissertação.

Ao meu amigo, colega e ex-sócio, Marcelo Arnt Brito, um dos principais “culpados” por mais esta batalha profissional. Meu agradecimento de coração, pelo apoio, pela amizade, pela paciência e pela constante motivação transmitida.

A Schering-Plough Saúde Animal Ind. e Com. Ltda., meu profundo agradecimento pela doação de todo o material necessário para a sincronização dos animais. Em particular aos queridos e especiais amigos, Dr. Rui Carlos Vincenzi, Dr. Sebastião Faria, Dr. Pedro Dias de Castro Gonçalves e ao médico veterinário Raul Orocil Soares de Abreu, pelo total apoio e confiança.

Aos meus filhos, Gabriel, Rafaela e João Pedro, bem maior de minha vida e motivação diária do meu trabalho. Obrigado pelo apoio, pelo amor, pela paciência, pela compreensão e pelo carinho.

A minha esposa Dalila, mulher de inigualável valor, amiga e companheira amorosa, que soube com paciência, compreender e suportar os inúmeros momentos de ausência, as intermináveis horas sentado estudando ou a frente do computador, escrevendo e digitando esta dissertação, os vários instantes de aflição e estresse ao longo desta caminhada. Sem dúvidas, teu amor, teu carinho e tua compreensão, foram e são, alavancas fundamentais para mim. Obrigado, te amo!

Agradeço, acima de tudo, a DEUS, por me conceder muita perseverança na realização de mais esta conquista profissional, por me presentear com mais uma gratificante parcela de amigos feitos ao longo deste período, por dar-me diariamente saúde para executar meus trabalhos, e por dar-me diariamente a graça do convívio de minha família e dos meus amigos.

**“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais volta ao seu tamanho original”.**  
**(Albert Einstein)**

**“Muere lentamente quien no arriesga lo cierto ni lo incierto para ir atrás de un sueño”.**  
**(Pablo Neruda)**

**“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e tudo que conseguiu foi através de esforços, e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas”.**  
**(Charles Chaplin)**

**“O único homem que nunca comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma”.**  
**(Roosevelt)**

## RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de dois diluentes comerciais, Dilutris<sup>®</sup> (SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) e TQC Holding Plus<sup>®</sup> (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brasil), na qualidade do sêmen, nas taxas de concepção utilizando inseminação artificial cervical (IAC) e por laparoscopia (IAL) e na reação inflamatória uterina após a inseminação laparoscópica. Para os testes *in vitro* do sêmen foram coletados seis ejaculados de dois carneiros. Cada ejaculado foi dividido em cinco frações de 0,20 mL, e acrescentado a cada fração o volume de diluidor equivalente a concentração da dose inseminante: para IAC ( $100 \times 10^6$  espermatozoides) e para IAL ( $40 \times 10^6$  espermatozoides), formando quatro tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente: Dilutris<sup>®</sup>/cervical; Dilutris<sup>®</sup>/laparoscopia; Holding<sup>®</sup>/cervical; Holding<sup>®</sup>/laparoscopia. Foram avaliadas a motilidade/ vigor, testes de termo-resistência e hiposmótico de cada fração. A motilidade e o vigor não diferiram entre os tratamentos e foram semelhantes aos verificados no sêmen fresco. No teste hiposmótico, os valores verificados no T4 e T1 foram semelhantes e não diferiram dos observados no sêmen fresco. Os valores observados nos tratamentos T2 e T3 não diferiram entre si, mas foram significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) aos verificados no T4. Os resultados do teste de TTR verificados em todos os tratamentos utilizados, foram superiores ao valor mínimo de 30% preconizado pelo CBRA. O T1 apresentou valor significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) ao dos demais tratamentos. Para a inseminação artificial, 208 fêmeas tiveram o estro sincronizado com esponjas vaginais contendo 60 mg de MAP por 13 dias e aplicação de 400 UI de eCG no momento da retirada. Foram inseminadas pela via cervical (IAC) ou por laparoscopia (IAL), 54 horas e 60 horas, respectivamente, após a retirada do dispositivo intra-vaginal, com sêmen diluído com Dilutris<sup>®</sup>, Holding<sup>®</sup> ou solução fisiológica (Grupo controle). Independentemente do diluente utilizado, os índices obtidos na IAL foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos obtidos pela IAC. Na IAC a taxa de gestação obtida no grupo inseminado com o diluente TQC Holding Plus<sup>®</sup> (45,6%), foi semelhante à verificada no grupo controle (48,9%). Já no grupo que foi inseminado com Dilutris<sup>®</sup>, a taxa de gestação (29%) foi inferior à obtida no grupo controle ( $P < 0,05$ ). Com relação aos aspectos histológicos, verificou-se um infiltrado inflamatório de neutrófilos de grau discreto a acentuado nos úteros inseminados por laparoscopia com Dilutris<sup>®</sup>, de ausente a moderado nos úteros inseminados com TQC Holding Plus<sup>®</sup>, e no grupo controle não houve presença de infiltrado inflamatório de neutrófilos. Pode-se concluir que na avaliação *in vitro*, o meio de manutenção de embriões TQC Holding Plus<sup>®</sup> não causou efeitos negativos na qualidade do sêmen, enquanto que o meio diluidor Dilutris<sup>®</sup> foi menos efetivo na manutenção da qualidade do sêmen. O local de deposição do sêmen teve influência significativa no índice de fertilidade ( $P < 0,05$ ). Por laparoscopia as taxas de gestação foram semelhantes independentemente do diluidor utilizado. Um maior número de avaliações uterinas são necessárias para um melhor conhecimento da reação inflamatória intra-uterina em ovinos inseminados por laparoscopia.

Palavras-chave: ovinos, indução do estro, inseminação artificial, laparoscopia, sêmen, reação inflamatória intra-uterina.



## ABSTRACT

*This study aims to assess the effects of two commercial diluents, Dilutris® (SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brazil) and TQC Holding Plus® (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brazil), on semen quality, conception rates using Cervical Artificial Insemination (CAI) and Laparoscopic Artificial Insemination (LAI), and uterine inflammatory reactions after the laparoscopic insemination. For the in vitro tests with the semen, six ejaculates of two rams were collected. Each ejaculate was divided into five fractions of 0.20 mL, and we added to each fraction the volume of extender equivalent to the concentration of the inseminant dose: for CAI ( $100 \times 10^6$  spermatozoa) and for LAI ( $40 \times 10^6$  spermatozoa), forming four treatments T1, T2, T3, and T4, respectively: Dilutris®/cervical; Dilutris®/laparoscopy; Holding®/cervical; Holding®/laparoscopy. The motility/vigor, thermo-resistance and hypoosmotic tests of each fraction was evaluated. The motility and vigor were not different between the treatments and were similar to those verified in fresh semen. In the hypoosmotic test, the values verified in T4 and T1 were similar and were not different from those observed in fresh semen. The values observed in T2 and T3 treatments have not differed between them, but were significantly lower ( $P < 0.05$ ) to those verified in T4. Results of the TTR test verified in all used treatments were superior to the minimum value of 30% preconized by CBRA. T1 presented a significantly lower value ( $P < 0.05$ ) compared to the other treatments. For artificial insemination, 208 female had their estrus synchronized with vaginal sponges containing 60 mg of MAP for 13 days and the application of 400 UI of eCG at the moment of removal. They were inseminated by cervical via (CAI) or by laparoscopy (LAI), 54 and 60 hours, respectively, after the removal of the intravaginal device, with semen diluted with Dilutris®, Holding® or physiological solution (control group). Independently of the extender used, the obtained rates in the LAI were superior ( $P < 0.05$ ) to those obtained with the CAI. In CAI the pregnancy rate obtained in the inseminated group with the TQC Holding Plus® diluent (45.6%) was similar to the one verified in the control group (48.9%). In the group inseminated with Dilutris®, the pregnancy rate (29%) was inferior to the obtained in the control group ( $P < 0.05$ ). Related to the histological aspects, we verified a discreet to accentuated degree of neutrophils inflammatory infiltrate in the uterus inseminated by laparoscopy with Dilutris®, from absent to moderate in uterus inseminated with TQC Holding Plus®, and in the control group there was not inflammatory infiltrate of neutrophils. We can conclude that in the in vitro evaluation, the embryos maintenance means TQC Holding Plus® has not caused negative effects in the quality of the semen, while the Dilutris® extender was less effective to maintain the quality of the semen. The semen deposition site has a significant impact in the fertility rate ( $P < 0.05$ ). By laparoscopy the pregnancy rates were similar independently of the extender used. A larger number of uterine analyses are required for a better knowledge of the intrauterine inflammatory reaction in sheep inseminated by laparoscopy.*

*Key-words: sheep, estrous synchronization, artificial insemination, semen, intrauterine inflammatory reaction.*

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Tratamentos experimentais utilizados.....49
- TABELA 2** - Motilidade (%) e vigor (0 a 5) de sêmen de carneiros diluídos em diferentes diluidores (Dilutris<sup>®</sup> e Holding<sup>®</sup>) e em diferentes concentrações (inseminação artificial cervical<sup>1</sup> e por laparoscopia<sup>2</sup>) a fresco, diluído e submetidos aos teste de termo-resistência (TTR - 38° C por 3 horas) e teste hiposmótico (150 mOsm/L, 37° C por uma hora) (média aritmética ± desvio padrão).....57
- TABELA 3** - Taxa de gestação (%) de ovelhas submetidas à indução de estro sincronizado (60 mg de MAP por 13 dias e 400 UI de eCG no momento da retirada) e inseminadas pela via cervical superficial (100x10<sup>6</sup> de espermatozóides, volume da dose 0,05 mL) ou por laparoscopia (40x10<sup>6</sup> de espermatozóides, volume da dose 0,25 mL), 54 horas e 60 horas após a retirada de dispositivo intra-vaginal, respectivamente, com sêmen de carneiros diluídos com Dilutris<sup>®</sup> ou Holding<sup>®</sup>.....60

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Imagem, em microscopia de contraste de fase, dos espermatozoides reativos ou reagentes (setas pretas) e dos espermatozoides não reativos (seta branca), após o período de incubação, 37° C por uma hora, em solução hiposmótica (150 mOsm/L), durante o teste hiposmótico (HOST).....50
- FIGURA 2** - Protocolo de sincronização e indução do estro em ovelhas para inseminação artificial cervical superficial (IAC).....51
- FIGURA 3** - Protocolo de sincronização e indução do estro em ovelhas para inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia (IAL).....53
- FIGURA 4** - Protocolo de sincronização e indução do estro em ovelhas para inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia (IAL) e abate para coleta do útero para avaliação da reação inflamatória pós-inseminação.....54
- FIGURA 5** - Cortes histológicos do endométrio de ovelhas submetidas a inseminação artificial por laparoscopia (IAL) e coletados seis horas após a inseminação.....63

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- IA – Inseminação artificial
- IATF – Inseminação artificial a tempo fixo
- IAC – inseminação artificial cervical superficial
- IAL – inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia
- eCG – Gonadotrofina Coriônica Eqüina
- PGF<sub>2</sub> $\alpha$  – Prostaglandina F<sub>2</sub> alfa
- MAP – Acetato de Medroxiprogesterona
- FGA – Acetato de Fluorogestona
- CL – Corpo lúteo
- GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
- LH – Hormônio luteinizante
- FSH – Hormônio foliculo estimulante
- P<sub>4</sub> – Progesterona
- NR – Não Retorno ao estro
- HOST – Hypoosmotic Swelling Test
- US – ultra-sonografia
- HE - hematoxilina-eosina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 Fisiologia reprodutiva do macho</b> .....	18
2.1.1 Espermatogênese.....	18
2.1.2 Controle hormonal da espermatogênese.....	19
2.1.3 Maturação e armazenamento dos espermatozoides.....	19
2.1.4 Ejaculação.....	21
<b>2.2 Diluentes / Diluidores</b> .....	21
2.2.1 Glicerol.....	23
<b>2.3 Avaliação do sêmen</b> .....	24
2.3.1 Volume.....	24
2.3.2 Movimento de massa.....	25
2.3.3 Aspecto.....	25
2.3.4 Odor.....	26
2.3.5 Cor.....	26
2.3.6 Densidade.....	26
2.3.7 Motilidade e vigor.....	26
2.3.8 Concentração.....	27
2.3.9 Porcentagem (%) de espermatozoides vivos.....	28
2.3.10 Morfologia.....	28
2.3.11 pH.....	29
2.3.12 Exames complementares.....	29
2.3.12.1 Teste de Termo-Resistência (TTR).....	29
2.3.12.2 Teste Hiposmótico (HOST).....	30
<b>2.4 Estacionalidade reprodutiva</b> .....	31
<b>2.5 Ciclo estral</b> .....	33
<b>2.6 Indução e sincronização do estro em ovelhas</b> .....	34
<b>2.7 Hormônios utilizados para indução e sincronização do estro</b> .....	35
2.7.1 Progestágenos.....	35
2.7.2 Prostaglandina F <sub>2α</sub> e seus análogos sintéticos.....	39
2.7.3 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG ou PMSG).....	41
<b>2.8 Inseminação artificial</b> .....	41

2.8.1 Tipos de inseminação artificial.....	43
2.8.1.1 Inseminação artificial cervical superficial.....	43
2.8.1.2 Inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia.....	45
<b>2.9 Reação inflamatória intra-uterina.....</b>	<b>46</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Localização.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Animais e delineamento experimental.....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Experimento 1 – Efeito de dois diluidores comerciais na qualidade do sêmen.....	49
3.2.2 Experimento 2 – Inseminação artificial cervical superficial utilizando dois diluidores comerciais.....	51
3.2.3 Experimento 3 – Inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia com dois diluidores comerciais.....	52
3.2.4 Experimento 4 – Efeito de dois diluidores comerciais na reação inflamatória intra-uterina após inseminação por laparoscopia.....	53
<b>3.3 Análises estatísticas.....</b>	<b>54</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Não é bem claro quando ou onde ocorreu a origem da civilização, mas sem dúvidas, a civilização está relacionada com a domesticação dos animais, sendo provavelmente o cão o primeiro vindo após os ovinos, os caprinos e depois os bovinos.

Seguindo, evoluindo e crescendo com a humanidade, os ovinos estabeleceram-se na vida das pessoas e consolidaram-se como fonte importante na economia de várias nações. Atualmente a população ovina mundial aproxima-se dos 1,2 bilhões de cabeças, ocupando grande parte dos ambientes impróprios para a agricultura como regiões montanhosas e semi-áridas. Estão associados também aos sistemas tradicionais de subsistência, principalmente nos países em desenvolvimento (OTTO DE SÁ; SÁ, 2008).

A distribuição populacional dos ovinos varia não só de acordo com fatores geográficos, mas também por questões históricas e comerciais. A Comunidade Européia detém um rebanho de aproximadamente 92 milhões de ovinos, historicamente importantes na produção de lã para a confecção de roupas e tapeçaria. Raças primitivas e de triplo propósito originárias de Itália e Países Bálticos foram sendo substituídos por raças especializadas em leite, principalmente em função da migração sazonal dos povos dependentes da utilização das pastagens naturais, mudando o número de ovinos nas diferentes regiões. Acompanhando o enriquecimento dos países, a revolução industrial e o crescimento da população urbana, os ovinos passaram a ser uma importante fonte de carne. Neste contexto, países como a Nova Zelândia e Austrália buscaram a diversificação e hoje contribuem com 80% das exportações mundiais de carne ovina para Europa e Japão (OTTO DE SÁ; SÁ, 2008).

No cenário brasileiro, a ovino-caprinocultura tem demonstrado um crescimento permanente, fruto da perseverança e retomada de investimentos de tradicionais criatórios, do aumento no consumo de carne ovina pela população, pela ampla adesão de novos criadores e pela mobilização do empresariado de vários setores motivado pelo excelente negócio que tem representado este segmento pecuário. Dados do IBGE em 2000 contabilizavam 14,6 milhões de ovinos e 8,07 milhões de caprinos. Informação contida no Anualpec (2007) revela uma população em torno de 16 milhões de ovinos e 10,3 milhões de caprinos. Estes índices representam um crescimento médio entre 1,5 a 3% ao ano. Regiões do Brasil, como no Estado de São Paulo, o registro de incremento dos rebanhos foi de 26,1% nos ovinos, passando de 257,4 mil para 324,7 mil cabeças, e

de 26,5% nos caprinos, aumento de 64,9 mil para 82 mil cabeças segundo dados da Aspaco (2008).

Até a década de 90, antes da crise mundial de lã, o Rio Grande do Sul registrava 24 cooperativas de beneficiamento de lãs e um rebanho de 13 milhões de cabeças, hoje possui apenas três cooperativas e um rebanho estimado em 3,7 milhões de cabeças.

Apesar desta diminuição significativa no efetivo ovino, a quantidade de lã produzida tem se mantido em torno das 10 mil toneladas/ano, segundo informações da FECOLÃ (2008), o que demonstra a especialização, a qualidade e a eficiência dos rebanhos gaúchos.

No mercado de carne, o Rio Grande do Sul sofre constantes ciclos de interferência com a entrada de produto importado do Uruguai, mesmo assim as regiões da Campanha e Fronteira-Oeste colaboram com aproximadamente 70% do efetivo abatido no Estado, segundo dados do Frigorífico Mercosul. Estes números significam uma média de 6 a 8 mil ovinos/mês abatidos de 2005 a 2008. Dados coletados junto as Supervisões Regionais do Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, demonstram que várias regiões não só retomaram o crescimento de suas populações ovina e caprina como também estabilizaram seus efetivos. Os números revelam que na região da Fronteira-Oeste, que engloba os municípios de Uruguaiana, Quaraí, Itaqui, São Borja, Barra do Quaraí, Maçambará e Santana do Livramento, os rebanhos ovino e caprino passaram de 911.364 para 961.042 e 1.140 para 1.766 cabeças respectivamente, entre 2006 e 2008. No mesmo período, a região da Campanha, formada pelos municípios de Bagé, Caçapava do Sul, Aceguá, Hulha Negra, Dom Pedrito, Candiota e Lavras do Sul, registraram um crescimento dos rebanhos ovino e caprino de 493.444 para 494.422 e de 7.254 para 11.773 cabeças respectivamente.

No sistema de produção de cordeiros a eficiência reprodutiva torna-se um fator preponderante, uma vez que o aspecto econômico está alicerçado na produção de cordeiros, pois a quantidade e a qualidade da lã são de baixo valor comercial (RIBEIRO, 2002). A estacionalidade reprodutiva da espécie ovina leva a uma sazonalidade na produção, limitando a implantação de sistemas intensivos de produção e reduzindo os ganhos econômicos dos produtores. Para reduzir estas perdas procura-se um manejo reprodutivo que permita pelo menos três parições a cada dois anos. Isso se torna possível com o estabelecimento de programas que incluam a seleção e o manejo



de reprodutores, condições ideais de nutrição e sanidade de todas as categorias do rebanho, acrescido de terapias hormonais durante o período do anestro estacional (RUBIANES, 2002). Nas condições de criação do Rio Grande do Sul, a estação reprodutiva das ovelhas está definida entre os meses de fevereiro a julho (MIES FILHO, 1960) e determina a adoção de metodologias específicas a serem utilizadas dentro e fora da estação reprodutiva, para a realização de trabalhos de inseminação artificial.

O uso de laparoscopia para a inseminação com sêmen fresco permite maior aproveitamento do reprodutor, pelo reduzido volume e concentração espermática da dose a ser depositada nos cornos uterinos. Nas situações em que haja estoque de sêmen congelado do reprodutor, a IA com sêmen fresco, por laparoscopia com sincronização do estro, evita a utilização destes estoques e permite a inseminação de um maior número de fêmeas, em curto espaço de tempo.

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de dois diluidores comerciais na qualidade do sêmen e nas taxas de concepção, utilizando dois métodos de inseminação artificial, cervical superficial e laparoscópica, bem como verificar a reação inflamatória uterina após a inseminação artificial por laparoscopia.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fisiologia reprodutiva do macho

#### 2.1.1 Espermatogênese

O processo de espermatogênese começa ainda no desenvolvimento fetal quando as células germinativas primordiais após migração da região do saco vitelínico para as gônadas indiferenciadas, dividem-se várias vezes até formarem as espermatogônias tronco ou gonócitos, estabelecidos nas paredes dos túbulos seminíferos (HAFEZ, 1982; EVANS; MAXWELL, 1990). Esta espermatogônia contém um número diplóide de cromossomos,  $2n=54$  na ovelha e  $2n=60$  na cabra, e permanecerá inativa até o início da puberdade. Nesta fase sofrerá mais divisões, passando a espermatogônia tipo A, depois para espermatogônia tipo A1, A2, A3 e A4. Esta última sofrerá nova divisão formando a espermatogônia tipo In que após nova divisão originará a espermatogônia tipo B (CLERMONT; BUSTOS-OREGON, 1968).

As espermatogônias tipo B sofrerão mais uma ou duas divisões para formarem os espermatócitos primários, que após outras duas divisões meióticas formarão os espermatócitos secundários, agora haplóides ( $n$  cromossomos), e finalmente as espermátides (HOCHEREAU DE REVIERS, 1970). As espermátides são transformadas em espermatozóides após uma série de modificações morfológicas progressivas conhecidas como espermiogênese. Ocorre condensação da cromatina nuclear, formação da cauda espermática ou aparelho flagelar e desenvolvimento do capuchão cefálico (BERNDTSON; DESJARDINS, 1974). Após estas modificações, as espermátides são liberadas para a luz dos túbulos seminíferos já com as características de espermatozóides. Este ciclo completo dos estágios é conhecido como “ciclo do epitélio seminífero” (LEBLOND; CLERMONT, 1952) e possui tempo variado dependendo da espécie, sendo 13,5 dias no touro (HOCHEREAU DE REVIERS, 1964), 8,6 dias no cachaço (SWIERSTRA, 1968), 10,3 dias na carneiro (ORTAVANT, 1959) e 12,2 dias no garanhão (SWIERSTRA, 1974).

A sequência de estágios ao longo do túbulo seminífero é conhecida como onda do epitélio seminífero, o tempo total desde a ativação da espermatogônia tronco até espermatozóide livre nos túbulos seminíferos varia de espécie para espécie, no caso dos ovinos e caprinos este tempo é de aproximadamente 45 a 49 dias (HOCHEREAU DE REVIERS, 1970).

Quando se interrompe este ciclo, seja por fatores de enfermidades ou estressantes, a fertilidade normal não se restabelecerá até que seja completado um novo ciclo espermatogênico, sendo igual situação apresentada na puberdade e no início da estação reprodutiva (EVANS; MAXWELL, 1990).

### 2.1.2 Controle hormonal da espermatogênese

Um dos principais estímulos endócrinos da espermatogênese é o andrógeno produzido pelas células de Leydig adjacentes aos túbulos seminíferos (HANSSON et al., 1975).

As gonadotrofinas LH e FSH também apresentam importância na espermatogênese, o LH estimulando as células de Leydig para a liberação de andrógeno e o FSH estimulando a produção de uma proteína fixadora de andrógeno (ABP) pelas células de Sertoli. Estas duas gonadotrofinas funcionam em conjunto para concentrar a testosterona e dihidrotestosterona dentro dos túbulos seminíferos (HANSSON et al., 1975).

O principal estímulo que afeta a secreção das gonadotrofinas é a duração de luz do dia (foto período), de tal forma que, dias mais curtos aumentariam sua secreção hipofisiária, estimulando a função reprodutiva. Apesar do número de horas de luz por dia na estação não reprodutiva reduzirem a secreção de gonadotrofinas, sempre há liberação suficiente destes hormônios para manter um nível, mesmo que baixo, de espermatozóides e andrógenos. Por esta razão, carneiros e bodes não chegam a ser estéreis durante a estação não reprodutiva, mesmo que apresentem diminuição no tamanho testicular, na produção de espermatozóides e redução na fertilidade. Fatores como temperatura, estado nutricional, enfermidades, fatores sociais ou estressantes, podem modificar a função hipofisiária do macho (EVANS; MAXWELL, 1990).

### 2.1.3 Maturação e armazenamento dos espermatozóides

As modificações funcionais dos espermatozóides ocorrem durante o trânsito pelo epidídimo e embora estejam em estado relativamente quiescente, quando retirados e examinados demonstram rapidamente seu estado móvel. O processo de maturação pelo qual os espermatozóides do epidídimo atingem a capacidade de motilidade progressiva parece implicar em modificações progressivas na flexibilidade e nos padrões de movimento de seus flagelos (BEDFORD, 1975). A medida que aumenta a capacidade de motilidade progressiva, os espermatozóides perdem água

progressivamente com um aumento correspondente da gravidade específica, ocorrendo também uma significativa modificação nas características superficiais da membrana plasmática dos espermatozóides (BEDFORD, 1975).

Durante o trânsito no epidídimo a gota citoplasmática migra da região do colo para uma posição próxima ao *annulus*. Esta migração ocorre próximo à época em que os espermatozóides passam da cabeça para a cauda. Sua presença em um número significativo de espermatozóides denota um sintoma de imaturidade, já que a gota, na maioria das espécies, é separada antes que ocorra a ejaculação.

Os espermatozóides são transportados para o epidídimo com o auxílio dos fluídos dos túbulos seminíferos e da rede testis, no carneiro pode atingir até 40 mL por dia, sendo reabsorvido no epidídimo e expulso menos de 1 mL (SETCHELL, 1970; EVANS; MAXWELL, 1987). Estão envolvidas também células semelhantes às da musculatura lisa na cápsula testicular (DAVIS, 1970) e as células da camada mióide da parede dos túbulos seminíferos (CLERMONT, 1958). Os ductos eferentes são revestidos com células epiteliais ciliadas, sendo a ação ciliar destas células as facilitadoras do transporte espermático para dentro da cabeça do epidídimo. O principal local de armazenamento é na cauda do epidídimo com 70% do total dos espermatozóides, enquanto que no canal deferente encontram-se apenas 2% do total (BEDFORD, 1975).

O desenvolvimento do potencial para manter a motilidade progressiva, as alterações nos padrões metabólicos juntamente com a situação estrutural de específicas organelas da cauda, as modificações na cromatina nuclear, as modificações na natureza da superfície da membrana plasmática, a movimentação e a perda da gota citoplasmática, bem como a modificação da forma do acrossoma, são alterações no desenvolvimento das habilidades fertilizantes dos espermatozóides ocorridas durante o trânsito no epidídimo (BEDFORD, 1975). Aproximadamente metade dos espermatozóides produzidos é reabsorvida nos ductos eferentes do touro (AMANN; ALMQUIST, 1962), outros na região ampolar (ORGEBIN-CRIST, 1962). Por outro lado uma eliminação seletiva dos espermatozóides anormais pelos macrófagos luminiais é realizada também no trajeto entre a cabeça e a cauda do epidídimo (ROUSSEL, 1967).

Quantidades consideráveis de espermatozóides são eliminados na urina na maioria das espécies. Em carneiros sexualmente inativos cerca de 87% da produção diária é eliminada na urina (LINO, 1967).

#### 2.1.4 Ejaculação

Antes da ejaculação os espermatozóides são transportados da cauda do epidídimo para as ampolas dos ductos deferentes mediante as secreções do conduto e das contrações da sua parede. Durante a ejaculação os espermatozóides entram na uretra onde se mesclam com as secreções das glândulas acessórias para melhorar sua motilidade. Com poderosas contrações a uretra expulsa o sêmen para o exterior finalizando o processo ejaculatório (EVANS; MAXWELL, 1987).

#### 2.2 Diluentes / Diluidores

Diluidores são substâncias líquidas que agregadas ao sêmen aumentam o volume do ejaculado além de proporcionar aos espermatozóides nutrientes, ambiente isotônico, proteção contra trocas de pH e proteção contra choque frio quando se resfria o ejaculado. Segundo Evans e Maxwell (1987), os diluentes para utilização com sêmen fresco classificam-se em sintéticos ou naturais. Os diluidores sintéticos mais comuns para uso em sêmen fresco de carneiros é o que contém o Tris e o Citrato como tampões, a glicose ou a frutose como fonte de energia e a gema de ovo como protetora da membrana espermática. Phillips e Lardy (1940) constataram que a gema do ovo protegia os espermatozóides contra os efeitos do rápido resfriamento ou choque térmico, e que suas lipoproteínas de baixa densidade, especificamente os fosfolípídeos, eram componentes efetivos na preservação e proteção da célula espermática. É sabido que ocorrem perdas desta lipoproteína pela membrana da célula causando diminuição na sua viabilidade. A adição da gema do ovo previne e modula tais perdas (PARKS; GRAHAM, 1992). A gema do ovo atua também como um tampão osmótico permitindo suportar meios tanto hiper como hiposmóticos (JONES; MARTIN, 1973).

Moussa et al. (2002) comprovaram que diluentes adicionados de 8% de lipoproteína de baixa densidade extraída de gema do ovo apresentaram-se mais eficientes na conservação do sêmen, que diluentes comerciais que continham maior percentagem de gema (Triladyl<sup>®</sup>) e extrato de soja (Biociphos<sup>®</sup>). A lipoproteína da gema do ovo, assim como as proteínas do leite (lactoninas) e alguns aminoácidos, exercem uma função crioprotetora não penetrante, ou seja, aumentam a osmolaridade do meio extracelular permitindo a passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo a formação de cristais de gelo no seu interior durante a congelação (AMANN; PICKETT, 1987).

Para machos caprinos estes diluentes também podem ser utilizados desde que respeitado o percentual máximo de 5% de gema de ovo, já que, nos reprodutores desta espécie o plasma seminal contém uma enzima, a lecitinase, produzida pelas glândulas bulbouretrais, que promove a coagulação de gema do ovo. Esta reação enzimática é inexistente quando se centrifuga o ejaculado destes reprodutores, permitindo assim a adição do diluente a base de gema com até 20% deste componente. Desenvolvido nas regiões norte e nordeste do Brasil, os diluentes a base de água de coco têm apresentado bons resultados na diluição e na manutenção da capacidade de sobrevivência de espermatozóides de caprinos (MELO; NUNES, 1991; SALLES; NUNES, 1993).

O leite de vaca é o melhor substituto para a gema de ovo, pode ser utilizado nas formas íntegra, desnatada ou em pó. Para utilizá-lo nas formas citadas, deve-se submetê-lo a um aquecimento prévio entre 92 a 95°C, durante 8 a 10 minutos, para inativação da sua fração protéica, a lecitina, que possui efeitos tóxicos aos espermatozóides (EVANS; MAXWELL, 1987; DURAN DEL CAMPO, 1993).

Pode-se utilizar também o leite UHT (embalagem Tetra Pak), que é tratado a temperaturas muito altas e já vem esterelizado. A adição de gema de ovo na proporção de 5 a 10% nos meios a base de leite, parece induzir a inativação do fator tóxico, superando o problema do aquecimento prévio, e mantendo adequadamente a fertilidade do sêmen bovino diluído e armazenado a 5° (FOOTE, 1960, 1978, 1993).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o processo de congelação promove sobre o espermatozóide (KARROW, 2001). Estas substâncias possuem características físico-químicas tais como: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (NASH, 1966). A ação destes agentes está diretamente relacionada a ação de redução do dano celular causado pelos efeitos da concentração dos sais no meio diluidor. São dotados de estruturas que permitem realizar ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo a formação de cristais de gelo, reduzindo o tamanho deles e diminuindo a concentração de soluto nos meios extra e intracelular (DALIMATA; GRAHAM, 1997). As ligações de hidrogênio promovem uma estabilização da estrutura quaternária das proteínas da membrana, preservando-a da desidratação (KARROW, 2001).

Esta habilidade de ligação ao hidrogênio da molécula da água é a característica mais importante de um bom crioprotetor (NASH, 1966). Karow (2001) também

estabeleceu uma diferença de toxicidade dos agentes crioprotetores penetrantes que seriam por efeitos farmacológicos e bioquímicos ou por injúrias físicas como por exemplo a osmolaridade. Esta toxicidade está influenciada pela concentração, momento de adição e temperatura em que será realizada a exposição da célula ao agente.

Os álcoois, etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e polietilenoglicol, assim como as amidas, incluindo a acetamida, formamida e lactamida, bem como o dimetilsulfóxido (DMSO), são componentes listados por Ashwood-Smith (1987) que podem ser utilizados como agentes crioprotetores penetrantes para a congelação de sêmen.

### 2.2.1 Glicerol

Quimicamente considerado como um álcool, o glicerol possui três grupos funcionais de hidroxilas que podem aceitar um hidrogênio da molécula de água em seis sítios distintos. Polge et al. (1949) utilizaram-no como crioprotetor do espermatozóide pela primeira vez. Desde então tornou-se amplamente utilizado na congelação de sêmen bovino. Seu efeito crioprotetor está relacionado a sua capacidade de ligação com a água e para a sua baixa dissociação com sais, diminuindo a osmolaridade do meio de congelação (POLGE et al., 1949).

Estas propriedades são favorecidas pela capacidade que possui em atravessar a membrana celular e manter a osmolaridade interna e externa. A concentração de glicerol utilizada é limitada pelo seu efeito tóxico, sendo este efeito dependente da taxa de resfriamento, velocidade de congelação, composição do diluidor e método de adição do glicerol (FAHY, 1986; WOELDERS, 1997). Tem sido relacionadas ao glicerol alterações nos microtúbulos do cito-esqueleto, sendo que estas alterações afetariam a interação com proteínas mudando as transduções ou causando quebra de domínio (PARKS; GRAHAM, 1992). Segundo Slavik (1987), o glicerol induz ou acelera a reação acrossomal em espermatozóides de carneiros sendo um fator de relação com as baixas taxas de prenhes em ovinos. Também no espermatozóide do homem (CRITSER et al., 1988) e de camundongos (KATKOV et al., 1998) o glicerol tem apresentado toxicidade.

Por outro lado, seu efeito tóxico apresenta-se diminuído quando em concentrações de 4% (FISER; FAIRFULL, 1984) e quando adicionado a temperaturas próximas de 0° C. Os espermatozóides do homem e de touros apresentam maior

resistência à adição de glicerol em uma única fase e com concentrações de 5 a 8% em comparação a outras espécies (AGCA; CRITSER, 2002).

### **2.3 Avaliação do sêmen**

O único teste capaz de avaliar com 100% de exatidão a eficiência e o grau de fertilidade de um reprodutor, utilizado em fêmeas sadias, seja por monta natural ou por inseminação artificial, e sob condições foto climáticas normais, é a percentagem de prenhes resultante no final da estação de monta ou da IA (DURAN DEL CAMPO, 1980).

A outra forma de se medir esta eficiência é por meio da avaliação da qualidade do sêmen. Esta avaliação, por mais criteriosa que seja, não pode pré-dizer com exatidão qual a capacidade fecundante final do reprodutor, mas oferece indicadores bastante confiáveis desta possibilidade. A constituição do ejaculado é formada por 74% de fluido seminal e de 26% de espermatozóides (ANDERSON, 1945; MANN, 1954). Do ponto de vista químico está formado por 86% de água e de 14% de matéria seca, constituída de minerais, vários aminoácidos, carboidratos, polissacarídeos, ácido láctico, ácido cítrico, proteínas, vitaminas e enzimas (ANDERSON, 1945; MANN, 1954).

Para proceder a avaliação é preciso extrair o sêmen do reprodutor por meio de vagina artificial ou por eletro-ejaculador. Manter especial cuidado com a higiene do material de coleta e de manipulação, assim como extrema atenção aos fatores de temperatura ambiente, banho-maria e incidência de luz solar que podem afetar a qualidade e a integridade do ejaculado. As provas de avaliação do sêmen compreendem os exames do volume, aspecto, movimento de massa, odor, cor, pH, densidade, motilidade progressiva, concentração, morfologia, percentagem de espermatozóides vivos e os testes complementares de termo-resistência (TTR) e hiposmótico (HOST).

#### **2.3.1 Volume**

O volume do ejaculado varia de acordo com a espécie e dentro da mesma espécie, esta variação poder estar relacionada ao tipo de alimentação a que está submetido o reprodutor, a sua raça, a estação reprodutiva, ao número de ejaculações sucessivas, a capacidade individual na produção diária de espermatozóides (volume do parênquima testicular), a idade do reprodutor, ao método de coleta que está sendo utilizado, ao tipo de vagina artificial, a habilidade do operador no ato da coleta e ao grau de excitação do reprodutor.



O volume normal médio ejaculado pelo carneiro é de 1,0 mL, variando de 0,5 a 3,0 mL (EVANS; MAXWELL, 1987; CBRA, 1998). Para os bodes o volume normal médio ejaculado também é de 1,0 mL porém a variação de volume é de 0,4 a 2,0 mL (MIES FILHO, 1982; CBRA, 1998).

A mensuração do volume ejaculado pode ser feita no momento da coleta e no próprio copo coletor graduado ou recipiente similar utilizado.

### 2.3.2 Movimento de massa

A avaliação do movimento de massa é feita por visualização macroscópica colocando-se o copo coletor ou recipiente graduado contra a luz. Este exame fornecerá elementos valiosos com relação ao grau de motilidade do ejaculado. Os movimentos de massa resultam da interação de três fatores: a) da intensidade de motilidade dos espermatozóides, b) da concentração espermática e c) do percentual de espermatozóides vivos (DURAN DEL CAMPO, 1980).

Qualquer variação que possa ocorrer em um destes fatores, interferirá no aspecto dos movimentos e nas características de ondas. Ejaculados com alta concentração e acima de 80% de espermatozóides vivos produzirão ondas espessas em forma de “flocos” ou “nuvens gigantes” chamadas de turbilhões, já num ejaculado com alta concentração porém com um alto percentual de espermatozóides mortos, estas ondas se apresentarão com aspecto espesso mas com movimentos lentos ou pouco vigorosos (MIES FILHO, 1982). Em um ejaculado de menor concentração estas ondas serão menos visíveis ou até mesmo inexistentes.

Para a avaliação microscópica do movimento de massa deve-se colocar uma pequena gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida a 37°C e visualizar em aumento de 100x. Os valores atribuídos serão de 0 a 5, onde 0 significa a ausência total de movimentos e 5 a presença de intensidade máxima das ondas, caracterizando um ejaculado com 90% ou mais de espermatozóides com motilidade progressiva.

### 2.3.3 Aspecto

O aspecto auxilia na avaliação macroscópica do sêmen fornecendo-nos uma idéia sobre a riqueza de espermatozóides contidos no ejaculado e, portanto, uma projeção, mesmo que empírica, sobre a concentração da amostra coletada. Nos ruminantes o aspecto cremoso deve-se a grande concentração de células espermáticas (DURAN DEL CAMPO, 1980).

#### 2.3.4 Odor

O sêmen deve ser inodoro, a presença de odor só se fará sentida quando da existência de substâncias estranhas à constituição normal do sêmen, ou seja, urina ou qualquer material infeccioso (MIES FILHO, 1982).

#### 2.3.5 Cor

A tonalidade normal do sêmen de reprodutores ovinos é branco-pérola ou marfim. Esta tonalidade poderá variar de acordo com a concentração espermática do ejaculado. Em condições anormais o sêmen pode adotar uma coloração vermelho claro quando misturado ao sangue vivo ou fresco, marrom ou vermelho-tijolo quando acrescido de sangue antigo ou coagulado devido a degradação da hemoglobina, esverdeada ou amarelada quando da presença de pus, ou amarelo turvo quando da mistura com urina (DURAN DEL CAMPO, 1980).

#### 2.3.6 Densidade

É uma valorização macroscópica da concentração, sua classificação para o sêmen está na razão direta do número de espermatozóides presentes no ejaculado e na razão inversa do volume (MIES FILHO, 1982).

Esta razão estabelecida nada mais é que a constatação de que quanto mais denso for o sêmen maior será a concentração de espermatozóides, ao passo que, quanto menor for a sua densidade menor será o número de células espermáticas contidas no ejaculado.

#### 2.3.7 Motilidade e vigor

É uma das principais características que devem ser analisadas no exame do sêmen para avaliar sua capacidade fecundante. Sua verificação e análise são feitas colocando-se uma gota de sêmen em lâmina pré-aquecida a 37°C e coberta com uma lamínula também na mesma temperatura e observada em aumentos de 100x e 400 x. (CBRA, 1998).

O tipo de motilidade se apresenta de acordo com a forma de deslocamento do espermatozóide, sendo progressivo quando a célula move-se em linha reta fruto da rotação do espermatozóide sobre seu próprio eixo aliado a movimentação propulsora da cauda, circular quando se movimentam em círculos sem progressão retilínea, retrógrado quando por anomalias da cauda a célula é deslocada para trás, e oscilatório quando se restringem a movimentos locais no mesmo campo microscópico (MIES FILHO, 1982).

A motilidade é expressa em percentagem e se quantifica estimando o número de espermatozóides vivos, e com movimento progressivo, observados no mesmo campo e em diferentes locais da amostra (DURAN DEL CAMPO, 1980). As variações na motilidade podem resultar da ação de fatores como choque térmico, soluções hipotônicas ou hipertônicas ou ainda substâncias crioprotetoras como o glicerol.

Quando o ejaculado é muito concentrado, deve-se utilizar uma gota de solução fisiológica ou de citrato-gema no mesmo volume e temperatura da gota de sêmen para melhor visualização da motilidade.

Paralelamente a avaliação da motilidade, avaliar-se-á o vigor com que as células espermáticas se movimentam. A avaliação do vigor se dará utilizando a classificação de Walton, sendo o resultado expresso em uma escala de 1 a 5, onde 1 significa que todos os espermatozóides estão imóveis, 2 significa espermatozóides só com movimentos oscilatórios com um grande número de imóveis, 3 significa metade com movimento progressivo e metade oscilatório, 4 significa que a maioria dos espermatozóides tem movimento progressivo e 5 significa que todos ou quase todos espermatozóides apresentam movimento progressivo (MIES FILHO, 1982).

### 2.3.8 Concentração

A concentração do sêmen depende da relação do conteúdo dos seus constituintes, ou seja, espermatozóides e plasma seminal. Ejaculados que contenham muitos espermatozóides possuem alta consistência, os que possuem menos células apresentam uma menor concentração e os que apresentam um aspecto aquoso indicam um número muito baixo de espermatozóides (EVANS; MAXWELL, 1987). Pode-se classificar a concentração do sêmen de carneiro de acordo com seu aspecto de consistência, estabelecendo uma estimativa do número de espermatozóides/mL contidos no ejaculado, sendo esta classificação correlacionada aos achados na contagem feita na câmara de Neubauer (EVANS; MAXWELL, 1987).

A determinação da concentração feita da câmara hematimétrica (contador de células sanguíneas), ou na câmara de Thomas Zeiss, ou na de Burker ou na de Neubauer, consiste em retirar uma amostra de 10 µl ou 20 µl de sêmen diluído em 2 mL ou 4 mL de uma solução de formol salina tamponada ou citrato de sódio formolado, caracterizando títulos de 1:200 ou 1:400 respectivamente. Para contagem na câmara de Neubauer retira-se uma alíquota desta solução e coloca-se entre a lâmina da câmara, que é formada por 5 quadrados grandes preenchidos por 16 quadrados menores, perfazendo

um total de 80 quadrados pequenos e uma lamínula (CBRA, 1998). Para a contagem utilizam-se aumentos de 100x e 400x, anotando o número de espermatozóides encontrados dentro do perímetro de cada quadrado maior valendo também os que estiverem com a cabeça em cima das linhas do “L” observado. Esta contabilidade deverá ser feita de ambos os lados da câmara dividindo o resultado final por dois para se obter o número total de espermatozóides da amostra. A diferença no número de células contabilizadas entre cada lado não deve ser superior a 10% (CBRA, 1998). O resultado será multiplicado por 10 milhões conhecendo-se assim o número total de espermatozóides por mL do ejaculado (EVANS; MAXWELL, 1987). A margem de erro na contagem utilizando a câmara hematimétrica pode alcançar índices de oito até 12% (SALISBURY; VANDEMARK, 1964).

#### 2.3.9 Porcentagem (%) de espermatozóides vivos

Lasley, Easley e Mckenzie (1942) notaram que alguns corantes eram absorvidos exclusivamente por células mortas e não eram retidos pelas vivas. Esta afinidade para com os corantes desenvolveu um método capaz de permitir e computar o percentual de espermatozóides vivos e mortos.

Inicialmente a eosina foi o corante de eleição para os testes, posteriormente diversos corantes foram utilizados com êxito, tais como a eritrocina, o rosa de bengala, o vermelho congo, a nigrosina e o azul de bromofenol. Swanson e Beardon (1951) consideraram que a eosina a 1% mais nigrosina a 5% formavam a associação de corantes mais perfeita para a avaliação de percentual de espermatozóides vivos e mortos.

Atualmente os corantes mais utilizados são a associação de eosina + nigrosina (EVANS; MAXWELL, 1990) e o azul de bromofenol a 7% (MIES FILHO, 1982).

#### 2.3.10 Morfologia

Importante ferramenta no estudo da valorização do sêmen. O exame morfológico é uma prova de controle de qualidade, e o percentual de células anormais está estreitamente relacionado com a fertilidade (EVANS; MAXWELL, 1987). As alterações morfológicas podem atingir uma ou mais partes do espermatozóide, ou seja, o acrossoma, o colo, a peça intermediária ou a cauda (MIES FILHO, 1982).

O exame morfológico deverá ser feito mediante a extração de uma amostra de sêmen que será colocada em uma solução de formol salina a 4% para promover a morte

da célula e sua imobilização. Desta solução se retira uma gota e se faz um esfregaço em uma lâmina tomando-se cuidado para não promover a decapitação das células. Após secar o esfregaço cora-se com o corante eleito. Os métodos de coloração podem ser o de Williams, o de eosina-nigrosina, o de Giemsa ou o de Cerovsky. O total de alterações morfológicas não pode ultrapassar 30% nos bovinos e 20% nos ovinos e caprinos (CBRA, 1998).

### 2.3.11 pH

O pH normal para o sêmen de ovinos é em torno de 6,8. Este valor pode estar aumentado, ou seja, alcalinizado, em amostras pouco concentradas ou mais acidificadas em ejaculados muito concentrados. O sêmen incubado a 32°C durante 30 minutos baixa seu pH em 0,5 pontos, podendo manter ainda uma boa fertilidade (WEBSTER, 1951). A técnica de verificação do pH é rápida e de fácil aplicação a campo, utiliza-se papéis indicadores reativos, que são umidificados por uma pequena parcela de sêmen retirada do ejaculado, sendo feita a leitura da reação de acordo com a coloração obtida (MIES FILHO, 1982).

### 2.3.12 Exames complementares

#### 2.3.12.1 Teste de Termo-Resistência (TTR)

O TTR é um teste para prever a capacidade fecundante de uma determinada amostra de sêmen. Apresenta alta correlação com a fertilidade a campo e o teste baseia-se em explorar a resistência dos espermatozoides ao estresse térmico, sendo o julgamento feito na avaliação da motilidade e na verificação da integridade do acrossoma (DIMITROPOULUS, 1967,1972; SAACK, 1970; FLEMING, 1976; MARSHALL; FREY, 1976). O TTR pode ser feito das seguintes formas:

1 – TTR Lento (TTR-L): Consiste em submeter a amostra de sêmen a 38°C por 5 horas para o sêmen bovino. Em ovinos mantém-se a mesma temperatura por 3 horas (CBRA, 1998). Uma amostra que apresenta 5% de movimento progressivo após o teste, revela uma baixa fertilidade (DIMITROPOULUS, 1972). Somente amostras que apresentem motilidade inferior a 35% após o TTR-Lento é que devem ser submetidas ao teste da integridade do acrossoma para um julgamento definitivo (MARSHALL; FREY, 1976);

2 – TTR Rápido (TTR-R): Consiste em submeter a amostra de sêmen a 46°C por 30 minutos (CBRA, 1998);

3 – TTR Estressando (TTR-E): Este teste consiste em expor a amostra de sêmen por 5 horas a 38°C na forma de teste lento e depois transferi-la para a refrigeração a 5°C por 24 horas (CBRA, 1998).

Para quaisquer dos testes de termo-resistência, a amostra será considerada apta se mantiver no mínimo 15% de espermatozóides com movimento progressivo para os bovinos e 30% para ovinos e caprinos (CBRA, 1998).

#### 2.3.12.2 Teste Hiposmótico (HOST)

Com a finalidade de avaliar a função da bioquímica da membrana espermática intacta, o teste hiposmótico (HOST) foi originalmente desenvolvido para a utilização em espermatozóides humanos (JEYENDRAN et al., 1984). O HOST também tem sido utilizado na avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de outras espécies, tais como eqüinos (ALVES et al., 2004), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST et al., 2003) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003).

O teste baseia-se na observação de que um espermatozóide com a membrana celular íntegra, quando exposto a uma solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até restabelecer o equilíbrio osmótico entre os líquidos intra e extra-celular (SANTOS et al., 2001). Com a entrada de água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), causando um posterior dobramento da cauda do espermatozóide (JEYENDRAN et al., 1984). Tem sido relatado em vários estudos, uma correlação do HOST com a fertilidade “in vitro” do sêmen de touros (ROTA et al., 2000), de hamsters (JEYENDRAN et al., 1984) e com a motilidade espermática do sêmen canino descongelado (KUMI-DIAKA, 1993).

O HOST também tem sido importante para comprovar intensas alterações da funcionalidade espermática em amostras que não seriam condenadas somente pelos resultados das avaliações de motilidade e morfologia espermática (MELO, 1999). A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide através do teste hiposmótico deve ser considerada como um indicador de fertilidade, visto ser um requisito básico para a fertilização esta integridade da membrana celular (MELO, 1999).

Jeyendran et al. (1984) descreveram a utilização da técnica para avaliação do espermatozóide humano, testando soluções de citrato de sódio (50%) e frutose (50%)

com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol/L, obtendo os melhores índices com a solução a 150 mOsmol/L. Melo (1999) objetivando padronizar o teste para a espécie equina, observou melhores taxas de reação utilizando soluções de 50 mOsmol/L a 150 mOsmol/L.

Fonseca et al. (2001) utilizando o teste em sêmen de caprino, observou maior porcentagem de espermatozoides reativos e com maior grau de reação (dobramento da cauda e edema) em soluções de 125 e 150 mOsmol/L.

#### **2.4 Estacionalidade reprodutiva**

A ovelha é um animal poli-éstrico estacional de dias curtos e a estimulação para a manifestação e intensificação de seus fenômenos reprodutivos estão relacionadas ao decréscimo do número de horas de luz por dia ou foto período (SENGER, 1999; FONSECA et al., 2005). Sua atividade reprodutiva está dividida em estação de anestro, de transição e de acasalamento. Sabidamente, ovelhas que habitam em regiões mais próximas ao paralelo 0° ou “linha do Equador” sofrem menos influência do foto período e, portanto, não apresentam ciclos reprodutivos sazonais tão marcantes quanto aquelas que habitam entre os paralelos 20° e 35° (JAINUDEEN, 2004). A domesticação, a pressão adaptativa e a distribuição cosmopolita das raças fizeram com que muitos grupos raciais ampliassem o período de atividade reprodutiva, tornando-as, em alguns casos, quase inexistentes (BICUDO, 2003). Ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova ou de raças nativas brasileiras apresentam atividade reprodutiva durante todo ano, mesmo em áreas próximas aos trópicos, o que não acontece com os ovinos lanados (FONSECA et al., 2005). As raças deslanadas, segundo Traldi (2000), não apresentam estacionalidade reprodutiva na Região Sudeste do Brasil. Já animais das raças de zonas temperadas quando introduzidas nos trópicos, gradativamente perdem a estacionalidade readequando seus padrões ao novo meio ambiente.

Os machos também sofrem influência do foto período na sua atividade reprodutiva (MIES FILHO, 1956; BARREL; LAPWOOD, 1979; MIES FILHO et al., 1979; GALLWAY, 1983). As maiores variações estacionais foram referidas no volume ejaculado e no percentual de anormalidades espermáticas. As variações estacionais também foram verificadas no tamanho testicular, conforme referido por Ortavant e Thibault, (1956), Ortavant (1961), Galloway (1972), Colas (1979), Mies Filho et al. (1979), Girão (1982), Moraes e Oliveira (1993).

As informações do foto período são recebidas pela retina que emite um estímulo nervoso até a glândula pineal que modula o ritmo de secreção de melatonina. A duração desta secreção é processada para regular a atividade hipotalâmica médio-basal e para modular a pulsatilidade da secreção de GnRH, a atividade hipofisiária e o eixo gonadal (LINCOLN; MAEDA, 1992; MALPAUX et al., 1993). A melatonina é secretada somente na escuridão, ficando a duração de sua secreção diferenciada entre os dias longos e os dias curtos (KARSCH et al., 1988).

Na estação de anestro os centros de liberação tônica de GnRH sofrem intensa sensibilidade ao controle retro-negativo do estrógeno. Desta forma, a inter-relação do eixo hipotálamo-hipófise e o estrógeno secretado pelo folículo em crescimento será negativa, não induzindo a ovulação. Os pulsos de LH são mantidos com baixa frequência e amplitude, resultado da baixa atividade ovariana e suficientes apenas para quantidades de estrógeno necessário para inibir o centro de liberação de GnRH (GINTHER, 1989; BICUDO, 2003).

Coelho et al. (2006), em estudo sobre a liberação anual de melatonina em 4 borregas Santa Inês com  $8,3 \pm 0,9$  meses de idade e  $44,2 \pm 0,8$  Kg, no sudeste do Brasil sob foto período natural (latitude  $21^{\circ}59'$ ), constataram que as concentrações de melatonina são maiores no início e no final da noite e durante o outono e inverno. A liberação de melatonina próxima ao final do anestro estacional modula a sensibilidade dos centros hipotalâmicos ao controle retro-negativo exercido pelo estrógeno, reestruturando os padrões de secreção de estrógeno pelos folículos ovarianos (KARSCH et al., 1984; BICUDO, 2003). Quando as concentrações de estrógeno atingem um determinado nível estimulatório nos centros pré-ovulatórios de LH, ocorre um pico de liberação deste hormônio ocasionando a ovulação dos folículos suficientemente desenvolvidos (KARSCH et al., 1984; GINTHER, 1995).

Na fase de transição observa-se uma fase lútea de curta duração que pode ser resultado da ovulação de um folículo antral prematuro (LEGAN et al., 1985). Nesta fase, as gonadotrofinas se elevam gradualmente, mas não o suficiente para manifestar estro e ovulação (EVANS; MAXWELL, 1990). As fêmeas neste estágio, entretanto, respondem favoravelmente a estimulação ovulatória quando se administra gonadotrofina exógena.



## 2.5 Ciclo estral

O ciclo estral é um conjunto de eventos que se repete sucessivamente a partir da interação existente entre o SNC, eixo hipotálamo-hipófise, ovários e o útero. Nos ovinos todo o processo está influenciado pelo foto período, ou seja, a relação luz/escurecimento diária, que acarretará a liberação de melatonina pela glândula pineal, sendo que o alargamento ou o encurtamento do tempo de secreção determinarão a troca na sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisiário aos estrógenos (KARSCH et al., 1988).

Na ovelha, o ciclo estral tem uma duração de  $17 \pm 2$  dias e se divide em uma fase luteal que se estende desde o dia dois (estro = dia 0) do ciclo até aproximadamente o dia 13, e uma fase folicular desde o dia 14 até o dia um do ciclo (RUBIANES, 2000).

Durante este período, os hormônios FSH e LH, secretados pela hipófise, controlam o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese, culminando na secreção de estrógenos que levam ao comportamento de estro (GINTHER, 1995).

O pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) conduz a ovulação do ou dos folículos pré-ovulatórios e a luteinização, caracterizada por alterações morfoquímicas com intensa angiogênese, proliferação de células fibroblásticas e hipertrofia das células da teça interna e da granulosa. Esta luteinização das estruturas foliculares remanescentes acarretará a formação do corpo lúteo (CL), que se desenvolverá e produzirá quantidades crescentes de progesterona até chegar a um platô por volta do dia seis (06) do ciclo, e que se manterá até a luteólise. A progesterona secretada exercerá diversos efeitos durante o ciclo: a) realiza um “priming” sobre os centros comportamentais do SNC de tal forma que a manifestação de estro será induzida pelo aumento posterior dos estrógenos na fase folicular; b) modula o desenvolvimento folicular de forma que o próximo pico de LH induza a formação de um CL normal; c) inibe a secreção uterina de  $\text{PGF}_2\alpha$  durante os primeiros dias da fase luteal; d) suprime a frequência de pulsos do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH) que por sua vez inibe a secreção tônica de LH (GINTHER, 1995).

Zarkawi et al.(1997) observaram que a concentração média de progesterona ( $\text{P}_4$ ) na fase luteal foi de  $11,0 \pm 3,3 \text{ nmol/l}^{-1}$  (5,8 a 18  $\text{nmol/l}^{-1}$ ). Já Minton et al. (1990) consideraram valores plasmáticos superiores a 3 ng/mL característico da fase de diestro ou gestação.

A duração do estro tem sido estimada por uma infinidade de autores em aproximadamente 20 a 30 horas, podendo sofrer variações, por exemplo, pela idade da

fêmea, já que ovelhas adultas possuem um estro mais prolongado que borregas, período da estação reprodutiva, presença ou não de machos, e também a cópula, que pode encurtar o estro em uma a duas horas (DURAN DEL CAMPO, 1959a; MIES FILHO, 1960; ROBERTSON; RAKHA, 1965).

Em geral, o momento da ovulação em ovelhas ocorre cerca de 24 a 30 horas após o início do estro (HUTCHINSON-ROBERTSON, 1966; McKENZIE; TERRIL, 1966), em ovelhas da raça Merino ocorre entre 25 a 30 horas (EVANS; MAXWELL, 1990). Quando maturam dois ou mais folículos, os ovócitos são liberados com uma diferença de duas a três horas entre um ovócito e outro (EVANS; MAXWELL, 1990).

## **2.6 Indução e sincronização do estro em ovelhas**

Moraes (2002) e Mergulhão et al. (2003) definem como sincronização do estro o encurtamento ou prolongamento do ciclo estral por meio de hormônios ou associações hormonais que induzam a luteólise ou que prolonguem a vida do CL. Já a indução de estro seria a indução da ciclicidade das fêmeas em anestro por meio da utilização de hormônios ou por práticas de manejo.

Diversos protocolos hormonais foram desenvolvidos para sincronizar o estro em ovelhas, sendo que a grande maioria está baseada na suspensão temporária do estro por meio de progestágenos (LUTHER et al., 2006). A indução e a sincronização do estro consistem em intervir na atividade hormonal reguladora do ciclo estral, controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovários, com a finalidade de uniformizar e concentrar o início do estro, visando melhor aproveitamento e otimização da técnica de IA, simplificação das técnicas de manejo, comercialização dos produtos em períodos pré-estabelecidos do ano e também concentrando o trabalho em poucos dias (MERGULHÃO et al., 2003; MENCHACA, 2004). Quando se projeta um sistema de produção intensivo, onde as partições devem ser organizadas em blocos ou utilizar o sistema três partos em dois anos, a sincronização do estro em ovinos é ferramenta indispensável (MORAES, 2002).

Em programas de reprodução assistida de ovinos, objetivando a quebra da estacionalidade reprodutiva, utilizando-se a inseminação artificial a tempo fixo (IATF) com ou sem observação do estro, é fundamental que se consiga induzir e sincronizar o momento da ovulação (MORAES, 2002; LUTHER et al., 2006).

Diversos métodos têm sido empregados pelos mais variados pesquisadores na indução e sincronização do estro em pequenos ruminantes: efeito macho (LUCIDI,

2001; MARTIM et al., 2004), indução hormonal por meio de implantes vaginais de P<sub>4</sub> associado ao uso de eCG (TAKADA, 2004), indução hormonal por meio de implantes de melatonina (TRALDI, 2000), uso de prostaglandina (RUBIANES, 2003) e a utilização do foto período artificial (MOBINI, 2002). Segundo Amarantidis et al. (2004), a resposta ovariana a sincronização do estro em ovinos pode variar de acordo com o tipo de esponja vaginal e de progestágeno, com o estágio da estação reprodutiva, com o meio ambiente, com o nível de estresse do indivíduo e com a prévia utilização ou não do efeito macho.

Aspectos como raça, estação do ano, idade da fêmea, se é nulípara ou plurípara e intervalo de dias do pós-parto, também têm sido considerados por outros pesquisadores como fatores de influência na resposta a sincronização do estro em ovinos (ANEL et al., 2006).

## **2.7 Hormônios utilizados para indução e sincronização do estro**

### **2.7.1 Progestágenos**

A utilização de progestágenos passou a ser comercialmente viável a partir de 1964 graças aos esforços de T.J. Robinson e seus colaboradores em Sydney, na Austrália, onde desenvolveram esponjas intra-vaginais impregnadas com este hormônio (ROBINSON, 1964). Até então, o método de controle da reprodução de ovelhas envolvia aplicações de doses repetidas de P<sub>4</sub> ou administrações orais de progestágenos na ração dos animais, o período necessário para o tratamento e o trabalho gasto para a administração da P<sub>4</sub> tornavam-se um enorme obstáculo anti-econômico e pouco prático para a aceitação comercial destas técnicas (DURAN DEL CAMPO, 1980; GODFREY, 1997). A eficiência dos tratamentos com progestágenos em ovelhas para sincronização do estro, tem sido utilizada e documentada amplamente (GORDON, 1971b; 1997).

Edgar e Ronaldson (1957) utilizando a via parenteral, demonstraram a existência de progesterona na veia ovárica da ovelha já a partir do terceiro dia do ciclo chegando a um pico de 1,8 mcg/mL no sétimo dia, este nível cai bruscamente no dia 16 do ciclo. Dados semelhantes foram observados por Robertson (1977) que evidenciou um aumento de P<sub>4</sub> por volta do dia quatro, partindo de concentrações basais de 0,2 ng/mL, concentrações também observados em ovelhas ovariectomizadas e ovelhas intactas em anestro, até um pico de 2 a 4 ng/mL no dia sete, declinando rapidamente no dia 15, aproximadamente 36 horas antes do início do próximo período de receptividade sexual.

Os implantes intra-vaginais de silicone contendo progesterona (Controlled Internal Drug Release Dispenser – CIDR) e as esponjas intra-vaginais impregnadas com progestágenos MAP (Acetato de Medroxiprogesterona) ou FGA (Acetato de Fluorogestona) são atualmente os dispositivos mais comumente utilizados para a sincronização do estro em ovelhas (AINSWORTH, 1983; BICUDO et al., 2002; DELIGIANNIS et al., 2005; LUTHER et al., 2006).

Segundo Greyling et al. (2004), o progestágeno contido nas esponjas intra-vaginais possui uma liberação muito alta no início do tratamento e diminui entre os dias dois e 13 do protocolo em até 63%. Resultados semelhantes foram constatados por Wheaton et al. (1993) e Rubianes (1998) avaliando a liberação de P<sub>4</sub> do CIDR, sendo observado um aumento das concentrações plasmáticas de progesterona durante os primeiros 3 a 4 dias, declinando estes níveis a partir do sexto dia de uso. O uso prolongado de implantes impregnados de P<sub>4</sub> ou similares alicerça-se no fato de que ocorrerá um tempo suficiente para a regressão luteal natural, dispensando a necessidade de agente luteolítico, independente da fase do ciclo estral (MENCHACA, 2001). Barret et al. (2004) obtiveram concentrações plasmáticas de progesterona entre 0 a 1 ng/mL após 12 dias de tratamento com esponjas impregnadas com MAP, níveis que correspondem as concentrações subluteais.

Se ocorrer uma diminuição na eficácia de liberação do progestágeno pela esponja com o passar do tempo, este fato pode ocasionar uma situação de concentrações subluteais de P<sub>4</sub>, aumento na frequência dos pulsos de LH podendo aumentar o crescimento dos folículos ovulatórios, semelhante ao descrito em bovinos (MIHM et al., 1999). Folículos persistentes que foram observados em ovelhas que receberam baixas dosagens de P<sub>4</sub> foram relacionados como causa de baixa fertilidade (JONHSON et al., 1996; UNGERFELD; RUBIANES, 1999; VIÑOLES et al., 2000). A explicação, segundo Menchaca e Rubianes (2004), é que durante o ciclo estral normal, a concentração de P<sub>4</sub> aumenta gradativamente até a luteólise, e quando utilizamos dispositivos impregnados com progestágenos, ocorre primeiro a elevação da concentração circulante de P<sub>4</sub> (níveis supraluteais) nos primeiros seis dias, reduzindo após este período à concentrações subluteais. Os mesmos autores afirmam que concentrações subluteais causam um crescimento excessivo do folículo maior e também um grau de persistência mais aumentado já que induzem a um aumento da pulsatilidade

do LH sem necessariamente produzir um pico pré-ovulatório, originando assim um folículo ovulatório mais velho.

Segundo Rubianes (1996) e Noel et al. (1994), a suplementação com progestágenos para níveis superiores ao da fase luteal normal promove a renovação folicular. Concentrações subluteais de progesterona durante o ciclo estral diminuem o crescimento do folículo dominante da primeira onda folicular (RUBIANES, 1996).

Doses baixas de progesterona durante a sincronização do estro em ovelhas, produzem folículos maiores e mais persistentes (JONHSON et al., 1996; VIÑOLES et al., 2000). Segundo Viñoles et al. (1999), níveis subluteais de progesterona induzem no folículo de maior diâmetro uma vida mais prolongada e um efeito de dominância mais extenso sobre os subordinados. Usualmente os tratamentos com progesterona ou seus análogos (progestágenos) para sincronizar o estro de ovelhas são de 12 a 14 dias (CROSBY et al., 1988).

Na ovelha o desenvolvimento folicular ocorre em forma de ondas, tanto na estação reprodutiva como na estação de anestro, ondas estas que emergem a cada quatro a seis dias, sendo o seu número mais freqüente observado o de três ondas foliculares (GINTHER, 1995; SOUZA, 1997; BARTLEWSKY et al., 1998; VIÑOLES et al., 2000). Segundo Jonhson et al. (1996), Flynn et al. (2000) e Viñoles et al. (2001), os tratamentos hormonais prolongados com progestágenos promoveriam o envelhecimento do folículo dominante, justificada pelo fato de que as ondas foliculares emergem a intervalos de quatro a seis dias e que há uma depleção do conteúdo do progestágeno das esponjas intra-vaginais diminuindo seus efeitos.

Para avaliar os resultados com protocolos de curta duração comparativamente aos de longa duração, Ungerfeld e Rubianes (1999) trabalharam com 22 ovelhas, divididas em três grupos, durante o anestro estacional, utilizando esponjas intra-vaginais impregnadas com MAP associadas a administração de eCG para indução do estro. No experimento, as esponjas foram mantidas por seis, nove e 13 dias, a percentagem de ovelhas em cio foi de 92,3%, 85,7% e 96,4% respectivamente para os dias de tratamento, sendo constatado um intervalo em horas para o início de estro de  $40,4 \pm 2,5$  para o tratamento de seis dias,  $42,4 \pm 2,0$  para o de nove dias e  $41,9 \pm 2,4$  para o de 13 dias. A taxa de concepção obtida neste primeiro experimento foi de 66,7%, 75% e 63% respectivamente para os tratamentos testados. Os autores concluíram que tratamentos curtos podem ser utilizados com êxito para a indução do estro em ovelhas, associados à

eCG, permitindo uma maior flexibilidade no trabalho a campo, entretanto deve-se ter assegurado que as esponjas liberem quantidades suficientes do hormônio.

Viñoles et al. (2001) avaliaram os efeitos do tratamento curto (seis dias) e do tratamento longo (12 dias) em ovelhas da raça Ideal utilizando esponjas impregnadas da MAP e servidas por monta natural. Segundo os autores, houve uma maior percentagem de ovelhas em cio nas primeiras 96 horas com o tratamento longo, sendo que a proporção nas 144 horas após a retirada da esponja não demonstrou diferença. A maior dispersão de cio nas ovelhas com tratamento curto pode ser atribuído ao fato de que algumas não sofreram luteólise no momento da retirada do dispositivo, entretanto a fertilidade dos cios induzidos dos tratamentos curtos foi significativamente melhor. A explicação destes índices melhores de fertilidade estaria no fato de que os tratamentos curtos promoveriam uma maior taxa de mudança folicular promovendo a ovulação de folículos mais jovens. Por outro lado, Evans et al. (2001) observaram que, mesmo prolongando a vida do folículo dominante, os tratamentos longos não provocaram consequências sobre a fertilidade.

Sendo o tratamento curto menos eficaz em sincronizar o cio em ovelhas cíclicas, pois em muitos animais o CL ainda é funcional no momento da retirada das esponjas, pode-se utilizar a aplicação de  $\text{PGF}_2\alpha$  concomitantemente ao uso do dispositivo intravaginal (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Em cabras, os mesmos autores citam que, a aplicação de  $\text{PGF}_2\alpha$  no momento da inserção da esponja produz bons índices de fertilidade.

Greyling et al. (1994) testaram a eficiência da sincronização do estro em ovelhas fora da estação reprodutiva utilizando esponjas impregnadas de MAP com concentrações de 60 mg, 40 mg e com 30 mg. Os animais foram divididos em três grupos, GI, GII e GIII, onde foram utilizadas esponjas com 60 mg, 40 mg, 30 mg e um grupo controle, respectivamente. O tratamento consistiu em manter o dispositivo intravaginal por 14 dias sendo aplicado no momento da retirada do mesmo uma dose de 300 UI de eCG. A média de duração dos estros induzidos em relação ao grupo controle (cio natural) foi, respectivamente,  $29,4 \pm 7,6$  vs  $25,9 \pm 6,8$  horas, não diferindo estatisticamente. Durante o estro foram coletadas amostras de sangue para verificar as concentrações circulantes de LH e  $\text{P}_4$ , sendo os valores observados de  $6,95 \pm 8,74$  e  $0,28 \pm 0,33$ ;  $9,17 \pm 13,88$  e  $0,33 \pm 0,47$ ;  $6,83 \pm 6,09$  e  $0,20 \pm 0,16$  ng/mL, respectivamente para os grupos GI, GII e GIII, não havendo diferença entre os tratamentos.

O pico de LH ocorreu 45,6; 46,8 e 42 horas após a retirada das esponjas intra-vaginais e 4,8; 3,6 e 0 horas após o início do estro, comparado a 6,0 horas do grupo controle. A taxa de concepção foi de 75,0%; 62,5% e 65,2% respectivamente para os grupos tratados, não diferindo entre eles, e 72,7% para o grupo controle.

Al-Kamali et al. (1990) compararam a fertilidade das esponjas intra-vaginais impregnadas com 30 mg de FGA ou com 60 mg de MAP em 2054 ovelhas, inseminadas artificialmente, e recebendo 500 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo após 14 dias de permanência. Os autores observaram um percentual de cordeiros nascidos de 71,5% com FGA e de 71,9% com MAP, o percentual de cordeiros nascidos por ovelha parida foi idêntico, ou seja, 1,80 cordeiros/ovelha parida para ambos progestágenos. As taxas de ovelhas com parto simples foi de 35,2% e 34,7%, para parto gemelar de 48,8% e 50,3%, para partos triplos ou mais foi de 16,0% e 15% utilizando FGA e MAP respectivamente.

#### 2.7.2 Prostaglandina $F_2\alpha$ e seus análogos sintéticos

A prostaglandina é uma substância secretada por diversos tecidos e com funções diferentes de acordo com o órgão produtor da mesma. Os primeiros isolamentos deste hormônio foram feitos no sêmen humano atribuindo-se a próstata sua elaboração e secreção, fato que originou sua denominação. As diferentes prostaglandinas variam em sua composição química e são caracterizadas com distintas letras, ou seja, prostaglandina A, prostaglandina E e a prostaglandina F, sendo que dentro desta última encontra-se a  $F_2\alpha$ , que é secretada pelo útero e que provoca a lise do CL (AUSTIN; SHORT, 1972; AULETTA; FLINT, 1988).

Esta luteólise é exercida por um mecanismo de contra-corrente, passando da artéria útero-ovárica para a veia homônima, evitando sua passagem pela circulação geral e principalmente pelos pulmões onde grande parte é inativada, indo atuar no ovário ipsilateral ao corno uterino que a produziu (GINTHER et al., 1989). Suas formas análogas sintéticas permitem-nos utilizá-las de forma exógena para provocar o mesmo efeito da forma endógena e no momento que desejamos (DURAN DEL CAMPO, 1993). A prostaglandina endometrial, determinante para a lise do CL, é também determinante para a queda da progesterona plasmática ao redor do dia 13 do ciclo estral dos ovinos. Quando utilizada de forma exógena, a  $PGF_2\alpha$  provoca a queda na concentração de  $P_4$  ( $< 0,25\text{ng/mL}$ ) dentro de oito a 12 horas, já em ovelhas não tratadas

a diminuição é de aproximadamente 1 ng/mL por dia (ACRITOPOLU et al., 1977; ACRITOPOLU; HARESIGN, 1980; RAHMANIAN; MURDOCK, 1987).

Houghton et al. (1995) observaram que ovelhas ovulavam folículos maiores durante o ciclo estral normal em relação a aquelas de cio induzido por  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Segundo Wiltbank e Niswender (1992), a responsividade do CL ovino assemelha-se a do bovino, estando portanto refratário a ação luteolítica da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena até os dias cinco ou seis do pós-estro. Rubianes et al. (2002) realizaram um experimento com 24 ovelhas da raça Corriedale, divididas em três grupos, onde administraram  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nos dias um, três e cinco do período pós-ovulatório, para avaliar o início do período responsivo do CL. O momento de detecção do cio foi estabelecido por rufiões (capões androgenizados) marcadores, todas as ovelhas que receberam  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nos dias três e cinco pós-ovulatório mostraram cio ao contrário do grupo do dia um, onde apenas uma apresentou cio. Todos os animais que apresentaram cio ovularam, sendo que o intervalo entre a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a ovulação foi entre 48 e 72 horas. Desta forma os autores demonstraram que, já a partir do dia três pós-ovulação o CL em ovinos é sensível a ação luteolítica da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena, permanecendo o período refratário somente nos dois primeiros dias após a ovulação. Rubianes et al. (2004), a partir deste experimento, desenvolveram um protocolo de sincronização denominado “Sinchrovyne<sup>®</sup>”, onde são realizadas duas doses de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com intervalo de sete dias entre elas, obtendo taxas de prenhes ao redor de 40% utilizando sêmen fresco e inseminação artificial a tempo fixo a partir das 42 a 48 horas após a segunda dose.

Segundo Duran del Campo e Duran Hontou (1993) e Duran del Campo e Cash (1982), obtém-se ao redor de 76% de ovelhas sincronizadas, porém com a desvantagem de que este cio induzido apresenta uma baixa fertilidade, ao redor de 25 a 30% de prenhes. Os mesmos autores recomendam descartar este primeiro cio induzido e utilizar o próximo cio natural, ainda que se produza uma certa dispersão, não muito ampla, na manifestação do estro.

Fischer Neto (2008), trabalhando com 749 ovelhas da raça Ideal na estação reprodutiva, aplicando duas doses de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena com intervalo de sete dias uma da outra, utilizando inseminação artificial com sêmen fresco com detecção de cio através de rufiões marcadores (capões androgenizados com Durateston<sup>®</sup> 250 mg, IM, Laboratório Organon do Brasil Ltda.), obteve 73,4% de ovelhas sincronizadas após as duas doses de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . A taxa de gestação na primeira dose foi de 38,0% e de 30,0% na



segunda dose. Todas as gestações foram confirmadas por ultra-sonografia 30 dias após a inseminação.<sup>1</sup>

### 2.7.3 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG ou PMSG)

A gonadotrofina coriônica equina é uma glicoproteína quimicamente formada por duas sub-unidades, alfa e beta, sendo a sub-unidade beta a principal responsável pelas ações hormonais semelhantes as do FSH e do LH na atividade molecular (GRAY, 1988). Possui uma grande quantidade de ácido siálico na sua molécula, o que lhe confere uma meia vida longa. Caracterizada como uma gonadotrofina de vida quase completa, capaz de induzir o desenvolvimento folicular, produção de estrógeno, luteinização, ovulação e síntese de progesterona (GRAY, 1988). Segundo McDonald et al. (1992), sua meia vida seria em torno de 26 horas já que não sofre filtração renal, permanecendo mais tempo na circulação. Smith et al. (1993) afirmam que este tempo em ovelhas pode chegar a até 60 horas. Segundo Barret et al. (2004), dependendo da dosagem, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) estimula o aumento da taxa ovulatória em ovelhas cíclicas, já que recruta pequenos folículos nos ovários e aumenta a taxa de crescimento de folículos antrais.

Segundo Luther et al. (2006), as taxas de gestação após inseminação artificial com sêmen congelado em ovelhas da raça Hampshire e Montadale, tratadas com progestágenos por 14 dias durante a estação cíclica, foi de 70,0% e de 50,0% quando associado a 400 UI de eCG ou não respectivamente. Os autores associaram os resultados ao maior número de ovulações por ovelha, com conseqüente elevação da concentração de progesterona circulante em função da maior e melhor quantidade e qualidade de corpos lúteos originados.

A eCG tem sido associada aos tratamentos de sincronização de cio em ovelhas com dispositivos impregnados com progestágenos, possibilitando a indução do estro com maior sincronia da ovulação, diminuindo a dispersão ovulatória e melhorando os índices de fertilidade em programas de IA e IATF (ALIFAKIOTIS, 1982; RUBIANES, 1996; MENCHACA; RUBIANES, 2004).

## 2.8 Inseminação artificial

O primeiro pesquisador a investigar, implantar e realizar uma inseminação artificial (IA) em mamíferos foi o fisiologista italiano Lazzaro Spallanzani em 1780.

---

<sup>1</sup> Dados coletados pelo autor, ainda não publicados.

Seguindo os trabalhos de Spallanzani, o russo Elias Ivanov, entre 1901 e 1905 efetuou as primeiras inseminações artificiais em ovinos (BONADONNA, 1937).

Por volta de 1932 desenvolveram-se as primeiras observações sobre a vitalidade do espermatozóide nos genitais da ovelha, os trabalhos de Kusenov relativos a construção da primeira vagina artificial para ovinos, o emprego de seringas para injetar micro-doses de sêmen durante a inseminação artificial de ovinos, e o lançamento das bases teóricas para a diluição de sêmen (BONADONNA, 1937).

A IA pode e deve ser empregada como instrumento de intensificação do manejo reprodutivo (BICUDO, 2003; BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). Quando utilizada nos sistemas de produção de caprinos e ovinos, a IA pode apresentar as seguintes vantagens:

- (a) instrumento de direcionamento para a aquisição de reprodutores geneticamente melhoradores;
- (b) diminuição da necessidade de um número maior de machos para realizar a mesma estação reprodutiva;
- (c) maximização do ejaculado do reprodutor em relação a monta natural;
- (d) instrumento de agregação genética em um maior número de fêmeas de um mesmo rebanho em relação a monta natural;
- (e) importante ferramenta para a produção de cordeiros sem sazonalidade quando associada aos métodos de sincronização de cio;
- (f) ferramenta indispensável em programas para teste de progênie;
- (g) prevenção na transmissão de doenças venéreas;
- (h) proporciona a aquisição de reprodutores em sistema de cooperativismo ou condomínio;
- (i) padronização dos cordeiros ao nascimento quando associada aos métodos de sincronização de cio;
- (j) produtos e sub-produtos mais valorizados pela qualidade genética agregada, entre outras.

Segundo Fonseca et al. (2005), o percentual de animais inseminados na caprinocultura tem aumentado em função da necessidade de tecnificar e intensificar o

sistema de produção nesta espécie. O mesmo autor alerta que devem ser adotados cuidados adicionais com os ovinos e caprinos, em relação aos bovinos, para garantir o máximo de eficiência da técnica.

As técnicas de IA podem ser descritas em três métodos, cervical superficial, trans-cervical e intra-uterina ou laparoscópica. Para os métodos cervical superficial e trans-cervical, os melhores resultados tem sido obtidos com a utilização de sêmen fresco ou resfriado, já para a técnica intra-uterina podemos atingir boas taxas de concepção tanto com sêmen fresco, resfriado ou congelado. A inseminação artificial cervical superficial com sêmen fresco com cio natural é o método mais utilizado e difundido em rebanhos comerciais de ovinos durante a estação cíclica, tendo um fator limitante para a sua realização quando o reprodutor encontra-se em uma propriedade diferente das fêmeas (FONSECA; SIMPLÍCIO, 2008).

Os resultados de um programa de inseminação artificial em ovinos dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos, relacionados com a fêmea (estacionalidade, estro natural ou sincronizado, morfologia genital), com o macho (estacionalidade, qualidade e conservação do sêmen), com a propriedade (condições ambientais, sanitárias, alimentares, de manejo) e da técnica utilizada (tipo de inseminação, local de deposição do sêmen, dose espermática, habilidade do técnico, etc.) (SHACKELL, 1990; DONOVAN et al., 2004; PAULENZ et al., 2004).

## 2.8.1 Tipos de Inseminação Artificial

### 2.8.1.1 Inseminação artificial cervical superficial

A IA cervical com sêmen fresco é a técnica mais utilizada uma vez que é uma técnica de aplicação fácil e rápida, com custos relativamente baixos e que permite a obtenção de resultados satisfatórios. Na França, 99% das inseminações realizadas em ovelhas são efetuadas por via cervical com taxas de fertilidade média com sêmen fresco de aproximadamente 65% (BODIN, 1997).

A inseminação cervical pode ser realizada a tempo fixo (IATF) após sincronização do estro, a maioria dos autores relata que o melhor horário é de 55 horas após a remoção dos dispositivos intra-vaginais para uma única inseminação, e de 48 e 60 horas, quando se utiliza a inseminação dupla (BUCKRELL et al., 1992; RUBIANES et al., 2004).

Os índices de fertilidade variam principalmente com o sêmen empregado e pela utilização de estros sincronizados ou naturais. Índices de 65-70% de fertilidade em IA cervical com sêmen refrigerado em ovelhas com estro sincronizado foram referidos por Colas (1979). Taxas de não retorno de 64% utilizando IA cervical com sêmen fresco no estro natural foram referidas por Paulenz et al. (2005).

Diversos autores citam que os volumes da dose de sêmen a serem utilizados em uma inseminação cervical superficial ou trans-cervical em ovinos, seriam entre 0,05 mL até no máximo 0,40 mL (RIET; ECHENIQUE; JAUNSOLO, 1938; LARREA, 1944; FILLAT, 1950; MIES FILHO, 1964), sendo que as concentrações espermáticas variariam de 12 a 125 milhões de espermatozóides. Harvez et al. (1986) utilizando 100 e 200 milhões de espermatozóides na dose inseminante, obtiveram 37,5% e 45,7% de prenhes, respectivamente, sugerindo que o aumento da concentração espermática na dose inseminante pode favorecer as taxas de concepção da inseminação cervical superficial em ovelhas com cio sincronizado com progestágenos. Segundo Menchaca e Rubianes (2004), a IATF pode ser uma grande ferramenta para programas de reprodução em rebanhos comerciais de ovinos e caprinos.

A utilização de sêmen resfriado oportuniza o aproveitamento de um reprodutor que não se encontra no mesmo local, para tanto se deve diluí-lo e resfria-lo a 5°C, podendo ser estocado por até 24 horas após sua coleta com aceitável grau de fertilidade para ovinos e por até 48 horas para os caprinos. O sêmen resfriado de ovino, conservado a 5°C, declina na sua fertilidade a um ritmo de 10 a 35% por dia de armazenamento (EVANS; MAXWELL, 1990).

Evans e Maxwell (1990) afirmam também que existe uma variação na profundidade de deposição do sêmen por via cervical, sendo na ovelha possível de praticar uma deposição de 1 cm ou mais, esta profundidade poderá sofrer uma variação de acordo com a idade, a raça e com a individualidade de cada fêmea. Já em cabras as mesmas variações são menos evidentes já que a apresentação anatômica cervical no momento do cio favorece a deposição do sêmen no interior do útero, dependendo do tipo de pipeta utilizada, em mais de 50% das fêmeas. Em estudo realizado com ovelhas da raça Merino, utilizando sêmen fresco com e sem diluição, com concentrações espermáticas distintas e com diferentes profundidades de penetração da cérvix, os mesmos autores observaram que quando a deposição foi realizada na entrada da cérvix com sêmen diluído contendo 400 milhões de espermatozóides, com diluição contendo

100 milhões e com diluição contendo 50 milhões, com um volume da dose inseminante de 0,1 mL, as taxas de concepção foram de 50%, 43,8% e de 25,7%, respectivamente.

Quando a deposição foi realizada a 1 cm de profundidade, com as mesmas concentrações espermáticas, as taxas variaram de 68,8%, 66,7% e 60,7%. Finalmente quando o sêmen foi depositado com mais de 1 cm de profundidade, as taxas de concepção obtidas foram de 71,7%, 71,4% e 66,7% respectivamente. Em cabras da raça Angorá, os mesmos autores obtiveram, com sêmen fresco diluído e com deposição de até 1 cm de profundidade, 42,0% de concepção, de 1,0 cm a 3,0 cm 58,3% e com deposição intra-uterina 69,1%, já com sêmen congelado e com os mesmos níveis de profundidade, as taxas de concepção foram 27%, 45,9% e 68,9% respectivamente.

Souza (2002), realizando inseminação artificial por via cervical, com tempo fixo, em ovelhas, com uma concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides, obteve uma taxa de concepção de 41,9% utilizando sêmen fresco e 21,5% utilizando sêmen refrigerado em Equitainer<sup>®</sup> por 24 horas. No mesmo estudo, quando as inseminações artificiais foram realizadas utilizando sêmen fresco e sêmen refrigerado, porém em ovelhas com estro natural, as taxas de concepção foram 78,6% e 71,4%, respectivamente, não diferindo estatisticamente.

#### 2.8.1.2 Inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia

A técnica consiste na deposição do sêmen diretamente nos cornos uterinos por meio de instrumentos utilizados em procedimento laparoscópico. A aplicação do sêmen nos dois cornos uterinos permite obter taxas de fertilidade mais elevadas comparativamente à inseminação num único corno (KILLEEN, 1982).

Simplicio et al. (2007), consideraram que além de permitir a suplantação da barreira física imposta pela condição anatômica da cérvix, a técnica favorece a redução da dose inseminante, pode ser usada independente da época do ano; do regime de manejo; do tipo de estro: natural, sincronizado ou induzido; da forma de apresentação e de preparação do sêmen (MAXWELL, 1986b; FINDLATER et al., 1991; GHALSASI; NIMBKAR, 1996; LUZ, 2000; HOLLINSSHEAD et al., 2002). Embora necessite de material sofisticado e de mão de obra especializada, permite obter taxas de concepção elevadas, até de 75%, com sêmen congelado (BUCKRELL et al., 1992).

A inseminação artificial intra-uterina, ou laparoscópica, tem sido a melhor técnica para utilização de sêmen congelado ovino, segundo Evans e Maxwell (1990), as

taxas de concepção normalmente são de 50 a 55%, podendo chegar até a 60 ou 75%. Os mesmos autores afirmam também que as taxas de concepção poderão sofrer influência dependendo do intervalo entre a retirada das esponjas e a inseminação, recomendando a deposição do sêmen a partir das 60 horas após a retirada das esponjas. Mesmo sendo um ato invasivo, a inseminação artificial intra-uterina não oferece risco de morte ao animal, a técnica possibilita a plena visualização do útero e a eleição do melhor ponto de deposição do sêmen, superando todas as barreiras cervicais (SALAMON; MAXWELL, 2000).

## **2.9 Reação inflamatória intra-uterina**

Alterações na presença de leucócitos podem afetar a implantação do embrião, porém, informações sobre a população leucocitária no trato reprodutivo de pequenos ruminantes é limitada.

A inseminação induz a uma rápida e transitória reação inflamatória no trato reprodutivo feminino, leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, se acumulam na cérvix e no endométrio, alguns dos quais migram através do epitélio para dentro do útero e do lúmen cervical (PANDYA; COHEN, 1985; DE, 1991; McMASTER et al., 1992; SANFORD, 1992). Segundo McMaster et al. (1992) e Tremellen et al. (1998), alguns componentes do sêmen induzem uma resposta inflamatória pós-inseminação, entretanto ainda não está bem esclarecido qual dos componentes causa tal reação, diferentemente de outras espécies como a alteração do fator de crescimento B no plasma seminal dos roedores que é o grande responsável pela reação (ROBERTSON et al., 1996; 1997; TREMELLEN et al., 1998;), a presença espermática nos eqüinos (KOTILAINEN, 1994; TROEDSSON et al., 1998; 2001; FIALA et al., 2007), o plasma seminal, os espermatozóides e a presença física do fluido seminal nos suínos (BISCHOF et al., 1994b; ROZEBOOM et al., 1999; MATTHIJS, 2003; O'LEARY et al., 2004).

Segundo Mattner (1963, 1966, 1969), a presença do sêmen na cérvix não induz uma reação inflamatória pois os espermatozóides acumulados no muco cervical estariam protegidos da fagocitose leucocitária. Recentemente foram encontradas manifestações acentuadas do agente pró-inflamatório Interleucina 8 pelo sêmen na cérvix de ovelha, sugerindo uma resposta inflamatória cervical do sêmen (MITCHELL, 2002). Segundo Troedsson et al. (2001), a presença do sêmen no lúmen uterino da égua parece recrutar leucócitos polimorfonucleares por ativação do sistema de complemento.

A presença de neutrófilos no lúmen uterino da égua ocorre 30 minutos após a inseminação, alcançando uma concentração máxima entre oito a 24 horas depois da inseminação (KATILA, 1995).

Segundo Troedsson et al. (2001), a concentração espermática e o volume inseminado tem importante papel na intensidade da reação inflamatória uterina em éguas. Scott et al. (2006) investigaram a alteração leucocitária em ovinos, acasalando 15 ovelhas em cio e avaliando o trato reprodutivo três, seis, 18, 24 e 48 horas após a monta.

Neste estudo, os autores observaram que a população leucocitária nos tecidos reprodutivos passou por mudanças significativas durante o período das 48 horas seguidas do início do estro. O número de neutrófilos foi significativamente reduzido no útero das ovelhas do grupo controle 48 horas após o estro, sugerindo que a infiltração de neutrófilos pode ser influenciada pelos hormônios ovarianos, semelhante ao que ocorre em ratos (KAUSHIC et al., 1998) e nos suínos (BISCHOF et al., 1994b). O número de outras células inflamatórias também foi reduzido nas 48 horas seguidas do estro, entretanto, o número de macrófagos na maior parte dos tecidos reprodutivos foi elevado nas três e nas 48 horas depois do início do cio, sugerindo uma influência reversa dos hormônios ovarianos. A cobertura promoveu um incremento na resposta leucocitária, aumentando significativamente o número de macrófagos e neutrófilos, entretanto o número de eosinófilos não se mostrou alterado.

No tecido uterino, o pico de neutrófilos foi evidente com seis horas depois da monta, já os macrófagos tiveram seu pico 18 a 24 horas após a monta, estes achados demonstram que a reação inflamatória imediata é provocada pelos neutrófilos, seguida mais tardiamente pelos macrófagos (COTRAN, 1999; KAPLANSKI et al., 2003). A infiltração de neutrófilos, por efeito da inseminação, cessa 48 horas após o término do estro, permanecendo apenas um número elevado na região cervical, provavelmente por este local ainda manter algum reservatório de sêmen em seu interior (MATTNER, 1966).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Localização**

O estudo foi realizado no município de Uruguaiana, Bioma Pampa, Estado do Rio Grande do Sul, localizado a 29°45'18'' de latitude sul e 57°05'16'' de longitude oeste. A região apresenta uma precipitação pluviométrica ao redor de 1.100 a 1.300 mm anuais e está em torno de 66 metros de altitude.

Os solos da região são, na sua grande maioria, de origem basáltica com uma vegetação do tipo estepe. Classifica-se como uma região de clima subtropical, as temperaturas oscilam de 0°C a 15°C durante o outono e inverno, e de 14°C a 39,5°C entre a primavera e o verão (IBGE, 2008).

As avaliações *in vitro* do sêmen foram desenvolvidas no laboratório de inseminação artificial da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **3.2 Animais e delineamento experimental**

Todos os animais foram selecionados quanto à ausência de enfermidades podais e tratados previamente aos experimentos com anti-helmínticos. Os reprodutores passaram por um exame andrológico prévio, e todas as fêmeas foram revisadas quanto a sua sanidade ginecológica. As inseminações foram realizadas entre os meses de março e maio de 2008, ainda durante a estação reprodutiva das raças ovinas utilizadas, e também em virtude de uma forte estiagem que acometeu a região durante os meses de dezembro, janeiro e meados de fevereiro.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2. Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro tratamentos que combinaram dois diluentes seminais e duas técnicas de inseminação artificial, conforme Tabela 1.



TABELA 1 - Tratamentos experimentais utilizados

Tratamentos Experimentais	Descrição do Grupo Experimental
T 1	Sêmen diluído em diluidor Dilutris <sup>®</sup> na concentração para IA cervical <sup>1</sup>
T 2	Sêmen diluído em diluidor Dilutris <sup>®</sup> na concentração para IA por laparoscopia <sup>2</sup>
T 3	Sêmen diluído em meio Holding <sup>®</sup> na concentração para IA cervical <sup>1</sup>
T 4	Sêmen diluído em meio Holding <sup>®</sup> na concentração para IA por laparoscopia <sup>2</sup>

<sup>1</sup> 100x10<sup>6</sup> espermatozoides.

<sup>2</sup> 40x10<sup>6</sup> espermatozoides.

### 3.2.1 Experimento 1 – Efeito de dois diluidores comerciais na qualidade do sêmen

Foram realizadas 12 coletas de sêmen de dois carneiros da raça Ideal, sendo seis ejaculados de cada reprodutor, por meio de vagina artificial. Logo após a coleta, os ejaculados foram analisados quanto ao volume e aspecto, diretamente no copo coletor.

A avaliação inicial da motilidade progressiva e do vigor foram feitas, após diluição em citrato-gema a 20%, entre lâmina e lamínula em aumento de 100x e 400x, sendo a motilidade avaliada em percentual e o vigor em uma escala de graus de 0 a 5.

A integridade funcional da membrana foi avaliada por meio do teste hiposmótico, sendo retirado da amostra 10 µl de sêmen e adicionados 2 mL de solução citrato-frutose, 150 mOsm/L, e incubados a 37° C por uma hora (FONSECA et al., 2001). Após este período, as amostras foram analisadas em microscópio de contraste de fase, em aumento de 400x. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra e considerados íntegros ou reagentes aqueles em que ocorreu enrolamento da cauda (Figura 1).

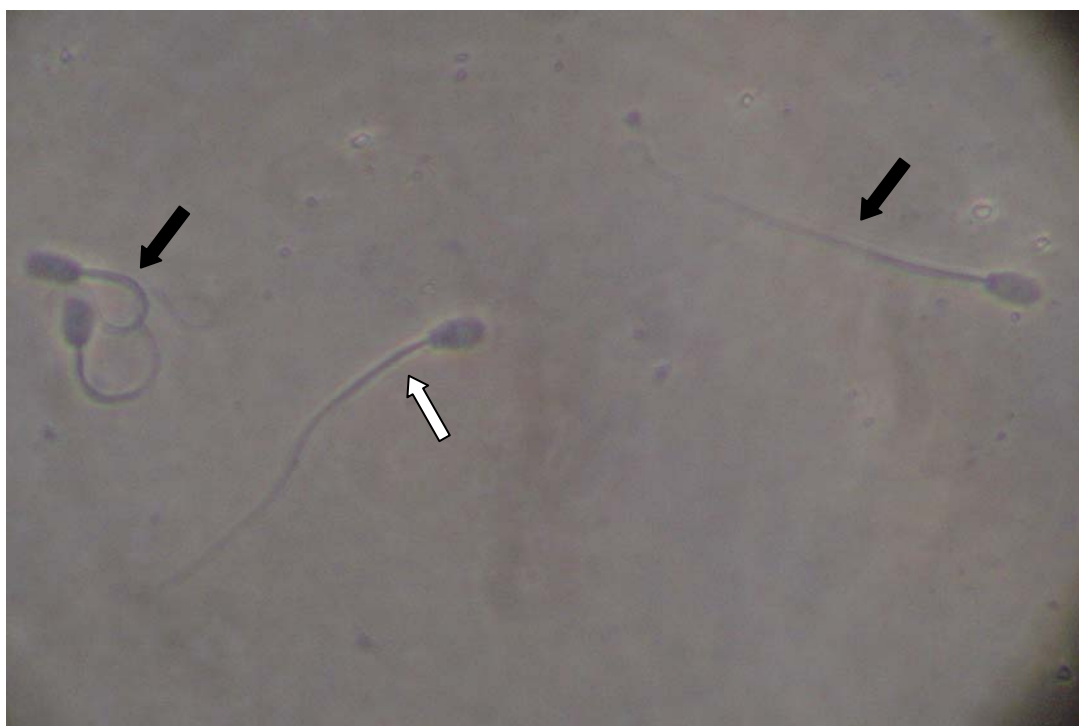


FIGURA 1 - Imagem, em microscopia de contraste de fase, dos espermatozoides reativos ou reagentes (setas pretas) e dos espermatozoides não reativos (seta branca), após o período de incubação a 37° C por uma hora em solução hiposmótica (150 mOsm/L), durante o teste hiposmótico (HOST).

A concentração foi calculada em câmara de Neubauer e após a contagem foi adicionada a fração de sêmen a respectiva quantidade de diluidor a ser testado. O volume final de diluente foi calculado para que fossem obtidas doses inseminantes de 100 e de  $40 \times 10^6$  de espermatozoides, conforme o requerido para as inseminações cervical e por laparoscopia, respectivamente. Para tanto, quatro alíquotas de sêmen puro de 200  $\mu$ l cada uma, foram diluídas em Dilutris<sup>®</sup> (SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) e TQC Holding Plus<sup>®</sup> (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brasil), para formar os grupos experimentais conforme referido na Tabela 1. Após a adição final do diluente, as amostras foram novamente avaliadas quanto a motilidade e vigor.

A seguir foram realizados os testes de TTR e hiposmótico de cada fração. O teste de termo-resistência utilizado foi o TTR-Lento, cujo protocolo para ovinos preconiza manter a amostra de sêmen por 3 horas a 38°C (CBRA, 1998). O teste

hiposmótico (HOST) e suas avaliações foram feitas conforme descrito por Fonseca et al. (2001; 2005).

O Dilutris<sup>®</sup> é um diluente composto por tris-gema-glicerol, indicado para o congelamento de sêmen de bovinos, ovinos e caprinos.

O TQC Holding Plus<sup>®</sup> é um meio, livre de soro fetal, utilizado para a manutenção de embriões por um período de tempo de até nove horas em ar atmosférico, em temperatura de 18 °C a 25 °C, ou até 20 horas em temperatura de 4 °C.

### 3.2.2 Experimento 2 – Inseminação artificial cervical superficial utilizando dois diluidores comerciais

Foram selecionadas 151 ovelhas da raça Ideal, entre dois e três anos (quatro a seis dentes), divididas aleatoriamente em três grupos, identificados como A (Dilutris<sup>®</sup>; SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil), B (TQC Holding Plus<sup>®</sup>; Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brasil) e C (sêmen fresco ou grupo controle). As ovelhas foram sincronizadas com esponjas intra-vaginais impregnadas com 60 mg de MAP (Progespon<sup>®</sup>; Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina) no dia 0 (D<sub>0</sub>), neste momento foram injetados na esponja 0,3 mL de oxitetraciclina<sup>2</sup> para diminuir o grau da vaginite, permanecendo com os dispositivos por 13 dias (D<sub>13</sub>). No momento da retirada das esponjas foi administrado 400 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina), 12 horas após a retirada foram colocados 5% de rufiões marcadores (machos vasectomizados) com tinta no peito para a identificação do estro, conforme ilustrado na Figura 2.

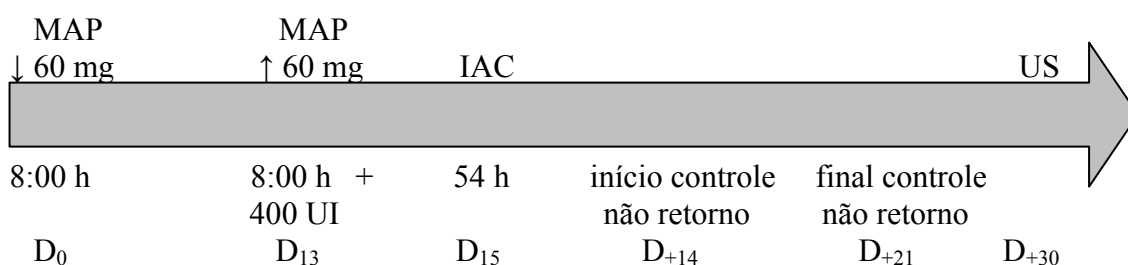


FIGURA 2 - Protocolo de sincronização e indução do estro em ovelhas para inseminação artificial cervical superficial (IAC).

<sup>2</sup> Ourotetra L.A., Laboratório Ouro Fino Saúde Animal Ltda.

A inseminação foi realizada somente nas ovelhas marcadas em cio, utilizando aplicador de sêmen para inseminação de ovinos e uma pipeta de 1 mL graduada em frações de 0,01 mL cada, acoplada ao aplicador.

A concentração total da dose inseminante foi de  $100 \times 10^6$  de espermatozoides e o volume da dose foi de 0,05 mL. A concentração foi calculada em câmara de Neubauer e adicionado a fração de sêmen a respectiva quantia do diluidor a ser testado. A inseminação cervical superficial foi realizada a tempo fixo a partir das 54 horas após a retirada dos dispositivos intra-vaginais. Para o grupo controle foi utilizado como diluidor, solução fisiológica pré-aquecida a 37°C.

A taxa de não retorno foi verificada por meio de rufiões marcadores (machos vasectomizados) a partir do 14° dia ( $D_{+14}$ ) até o 21° dia ( $D_{+21}$ ) pós-inseminação, e o diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias ( $D_{+30}$ ) após a inseminação por meio de ultrassonografia transretal (Transdutor linear de 6 MHz; Falcon 100<sup>®</sup>, Esaote Pie Medical Equipment B.V., Maastricht, Holanda).

### 3.2.3 Experimento 3 – Inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia com dois diluidores comerciais

Foram utilizadas 75 ovelhas da raça Ideal, entre dois e três anos (quatro e seis dentes), divididas aleatoriamente em três grupos, denominados A (Dilutris<sup>®</sup>, SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil), B (TQC Holding Plus<sup>®</sup>, Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brasil), e C (Sêmen fresco ou grupo controle). As ovelhas foram sincronizadas com esponjas intra-vaginais impregnadas com 60 mg de MAP (Progespon<sup>®</sup>, Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina) no dia 0 ( $D_0$ ), neste momento foram injetados na esponja 0,3 mL de oxitetraciclina<sup>3</sup> para diminuir o grau da vaginite, e mantidas por 13 dias ( $D_{13}$ ). No momento da retirada foi administrado 400 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina), sendo colocados rufiões marcadores (machos vasectomizados) a partir das 12 horas após a retirada das esponjas para a identificação do estro conforme ilustrado na Figura 3.

---

<sup>3</sup> Ourotetra L.A., Laboratório Ouro Fino Saúde Animal Ltda.

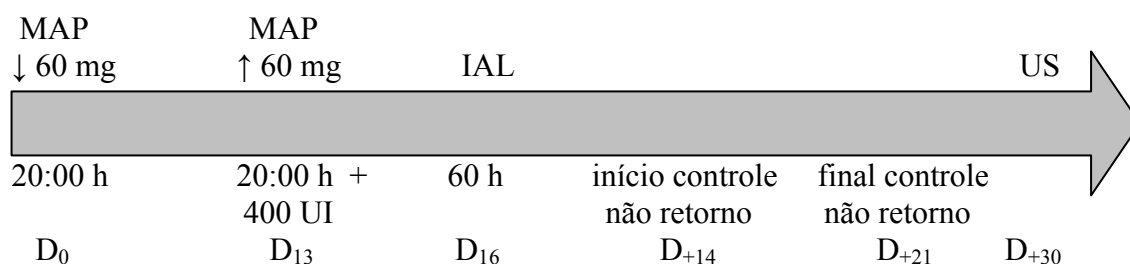


FIGURA 3 - Protocolo de sincronização e indução do estro em ovelhas para inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia (IAL).

A inseminação laparoscópica foi realizada 60 horas após a retirada dos dispositivos intra-vaginais, somente nas ovelhas marcadas em estro. A concentração total da dose inseminante foi de  $40 \times 10^6$  de espermatozoides e o volume da dose foi de 0,25 mL, fracionado metade em cada corno uterino. Todas ovelhas inseminadas foram submetidas a jejum prévio de 10 horas.

A taxa de não retorno foi verificada por meio de rufiões marcadores (machos vasectomizados) a partir do 14º dia (D<sub>+14</sub>) até o 21º dia (D<sub>+21</sub>) pós-inseminação, e o diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias (D<sub>+30</sub>) após a inseminação por meio de ultrassonografia transretal (Transdutor linear de 6 MHz; Falcon 100<sup>®</sup>, Esaote Pie Medical Equipment B.V., Maastricht, Holanda).

#### 3.2.4 Experimento 4 – Efeito de dois diluidores comerciais na reação inflamatória intra-uterina após inseminação por laparoscopia

Foram utilizadas seis ovelhas da raça Corriedale, entre três e quatro anos (seis e oito dentes), divididas aleatoriamente em três grupos, denominados A (Dilutris<sup>®</sup>, SEMENCON – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) contendo dois animais, B (TQC Holding Plus<sup>®</sup>, Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brasil) contendo dois animais e C (sêmen fresco ou grupo controle) contendo dois animais. No grupo controle o diluidor utilizado para as inseminações foi soro fisiológico pré-aquecido a 33 °C.

As ovelhas foram sincronizadas com esponjas intra-vaginais impregnadas com 60 mg de MAP (Progespon<sup>®</sup>, Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina) no dia 0 (D<sub>0</sub>), neste momento foram injetados na esponja 0,3 mL de oxitetraciclina<sup>4</sup> para diminuir o grau da vaginite, e mantidas por 13 dias (D<sub>13</sub>). Na

<sup>4</sup> Ourotetra L.A., Laboratório Ouro Fino Saúde Animal Ltda.

retirada das esponjas foi administrado 400 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina), e foram colocados rufiões marcadores (machos vasectomizados) 12 horas após a retirada das esponjas para a identificação do estro. As ovelhas foram inseminadas 60 horas após a retirada dos dispositivos sendo sacrificadas seis horas após a inseminação para a coleta do útero, conforme ilustrado na Figura 4.

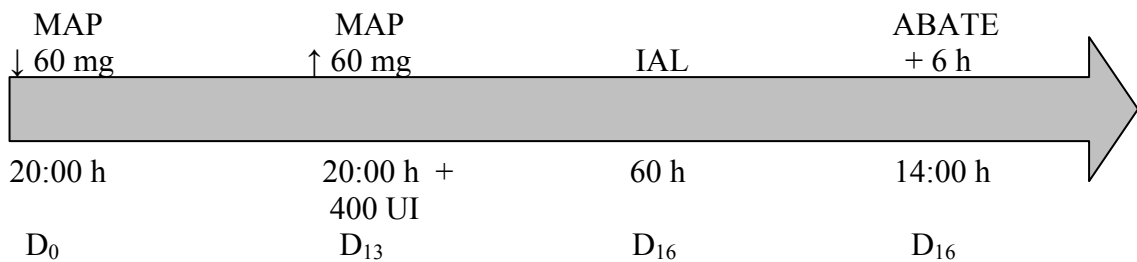


FIGURA 4 - Protocolo de sincronização e indução do estro em ovelhas para inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia (IAL) e abate para coleta do útero para avaliação da reação inflamatória pós inseminação.

O material coletado foi cuidadosamente retirado do animal, separado o útero e os cornos uterinos da parte contendo a cérvix e a porção vaginal, sendo o útero e os cornos uterinos posteriormente colocados dentro de um vidro previamente limpo e esterilizado. Neste momento foi injetado, pelo corpo do útero em direção aos cornos uterinos, 60 mL de formol tamponada a 4% para fixação do conteúdo e dos tecidos, permanecendo este material submerso e encoberto pelo formol tamponada até o encaminhamento ao Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para análise histológica.

Fragmentos dos úteros coletados foram fixados em formalina tamponada 10% por 48 horas, processados rotineiramente para exame histopatológico, incluídos em parafina, cortados a 5µm de espessura, e corados pela hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET et al., 1992). As lâminas histológicas foram examinadas em microscópio óptico, e o grau de inflamação foi caracterizado em ausente (-), discreto (+), moderado (++) ou acentuado (+++).

### 3.3 Análises estatísticas

A análise estatística compreendeu a análise de variância não-paramétrica de dados para comprovação de diferenças entre parâmetros observados entre os

tratamentos. Valores de motilidade, vigor e reação hiposmótica passaram por transformação arco-seno. Médias de motilidade testadas pelo teste de Kruskal-Wallis (5%) e processadas pelo SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, RIBEIRO JÚNIOR, 2001). Médias de vigor e reação hiposmótica foram testadas pelo teste de Friedman (5%) e taxas de gestação foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado processadas pelo programa BioEstat 3.0 (AYRES et al., 2000).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios das características do sêmen de carneiros, diluídos com dois diluidores comerciais e em diferentes concentrações, encontram-se na Tabela 2.

A motilidade e o vigor não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos e foram semelhantes aos verificados no sêmen fresco (diluído em citrato-gema), indicando que logo após a diluição, os diferentes tratamentos foram capazes de manter os mesmos índices observados no sêmen fresco.

No teste hiposmótico, os valores verificados no T4 ( $60,25 \pm 6,26$ ) não diferiram ( $P>0,05$ ) dos observados no sêmen fresco ( $60,75 \pm 4,16$ ) e dos observados no T1 ( $56,91 \pm 3,70$ ), indicando que a combinação diluente/diluição manteve a integridade funcional da membrana espermática. O valor médio de  $60,75 \pm 4,16$ , observado no sêmen fresco, foi semelhante ao observado por Fonseca et al. (2005) no sêmen fresco de reprodutores caprinos.

Os valores observados nos tratamentos T2 ( $53,17 \pm 6,35$ ) e T3 ( $55,33 \pm 5,99$ ), não diferiram ( $P>0,05$ ) entre si, mas foram significativamente inferiores ( $P<0,05$ ) aos verificados no T4. Assim, nos tratamentos T2 e T3, a combinação diluente/diluição provocou uma redução na integridade da membrana espermática logo após a diluição.

A ausência de variação entre os tratamentos T1 ( $56,91 \pm 3,70$ ) e T3 ( $55,33 \pm 5,99$ ) indica que, na diluição utilizada para a IA por via cervical superficial (IAC), os dois diluentes preservaram a membrana espermática de forma semelhante. A diferença ( $P<0,05$ ) verificada entre os tratamentos T2 e T4 pode indicar que, na diluição e na dose para a IA por laparoscopia (IAL), onde foi empregado volume superior de diluente ao requerido para a IAC, o diluente TQC Holding Plus<sup>®</sup> foi mais efetivo na preservação da integridade da membrana espermática.

Pode-se considerar o teste hiposmótico como um importante complemento na avaliação da fertilidade, já que avalia a integridade funcional da membrana espermática, requisito básico para que ocorra a fertilização, e desta forma ser utilizado em conjunto com as demais avaliações do sêmen (KUMI-DIACA, 1993; MELO, 1999; FONSECA et al., 2001; 2005; SANTOS et al., 2001; OBERST et al., 2003; SALGUEIRO et al., 2003; ALVES et al., 2004).



TABELA 2 - Motilidade (%) e vigor (0 a 5) de sêmen de carneiros diluídos em diferentes diluidores (Dilutris® e Holding®) e em diferentes concentrações (inseminação artificial cervical<sup>1</sup> e por laparoscopia<sup>2</sup>) a fresco, diluído e submetidos aos teste de termo-resistência (TTR - 38° C por 3 horas) e teste hiposmótico (150 mOsm/L, 37° C por uma hora) (média aritmética ± desvio padrão).

Parâmetros	Sêmen Fresco	Dilutris Cervical	Dilutris Laparoscopia	Holding Cervical	Holding Laparoscopia
Motilidade* (%)	87,08 ± 4,50 (12)	85,83 ± 4,17 (12)	86,25 ± 4,83 (12)	85,83 ± 3,59 (12)	86,25 ± 4,83 (12)
Vigor** (0-5)	3,95 ± 0,14 (12)	4,00 ± 0,00 (12)	3,92 ± 0,36 (12)	4,20 ± 0,26 (12)	4,29 ± 0,26 (12)
Hiposmótico** (%)	60,75 ± 4,16 <sup>a</sup> (12)	56,91 ± 3,70 <sup>a,b</sup> (12)	53,17 ± 6,35 <sup>b</sup> (12)	55,33 ± 5,99 <sup>b</sup> (12)	60,25 ± 6,26 <sup>a</sup> (12)
TTR motilidade* (%)	-	43,33 ± 11,55 <sup>b</sup> (12)	72,08 ± 8,65 <sup>a</sup> (12)	67,92 ± 10,76 <sup>a</sup> (12)	75,42 ± 9,16 <sup>a</sup> (12)
TTR vigor** (0-5)	-	2,08 ± 0,51 <sup>b</sup> (12)	2,33 ± 0,49 <sup>b</sup> (12)	3,21 ± 0,65 <sup>b</sup> (12)	4,17 ± 0,25 <sup>a</sup> (12)

( ) Número de animais.

\* <sup>a,b</sup> letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis 5%.

\*\* <sup>a,b</sup> letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05) pelo teste de Friedman 5%.

<sup>1</sup> 100x10<sup>6</sup> de espermatozoides.

<sup>2</sup> 40x10<sup>6</sup> de espermatozoides.

No teste de termo-resistência (TTR), os valores observados nos tratamentos T2 ( $72,08 \pm 8,65$ ), T3 ( $67,92 \pm 10,76$ ) e T4 ( $75,42 \pm 9,16$ ) foram semelhantes ( $P > 0,05$ ). Os valores obtidos no T1 ( $43,33 \pm 11,55$ ) foram significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) aos demais tratamentos.

Para amostras de sêmen congelado ovino, o padrão de aprovação pelo CBRA (1998), após o TTR é de 30% de motilidade. Os resultados do teste de TTR verificados em todos os tratamentos utilizados, embora provenientes de amostras de sêmen fresco, foram superiores ao valor mínimo requerido, o que pode assegurar a qualidade das amostras de sêmen avaliadas. Como os testes de termo-resistência apresentam altas correlações com a fertilidade a campo (Dimitropoulos, 1967; 1972), e podem ser indicadores da fertilidade potencial das amostras, os resultados da avaliação *in vitro* do sêmen também sugerem que os índices de fertilidade após a inseminação sejam aceitáveis.

Ao se comparar a motilidade inicial do sêmen com a obtida após o teste de TTR, verifica-se que no T1, ocorreu uma queda de 49,5% (85,83 para 43,33). Nos demais tratamentos, a redução verificada foi inferior a 20%. A queda acentuada ocorrida na motilidade espermática indica que o T1 foi o tratamento menos efetivo em manter a motilidade quando a amostra foi submetida a um estresse térmico, como o que ocorre no referido teste.

A taxa de diluição utilizada na produção das doses para o uso na IAC, pelo menor volume de diluidor acrescentado, independentemente do diluidor empregado, pode também ter contribuído para que as células espermáticas apresentassem menor capacidade de suportar o estresse térmico ocasionado pelo teste. Esta possibilidade pode ser considerada, quando analisados os valores de motilidade após o TTR dos tratamentos T1 e T3.

No presente experimento, a avaliação do vigor espermático deve ser considerada como mais um indicador da qualidade do sêmen, embora não seja levado em conta pelo CBRA (1998) para o julgamento de amostras submetidas ao teste de TTR. O vigor espermático apresentou tendência semelhante a que foi observada na motilidade espermática.

Os tratamentos T1, T2 e T3 não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ), com valores de  $2,08 \pm 0,51$ ;  $2,33 \pm 0,49$  e  $3,21 \pm 0,65$ , respectivamente, e foram significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) ao T4.

No tratamento T4, o índice de  $4,17 \pm 0,25$  de vigor, associado ao índice de motilidade de  $75,42 \pm 9,16$  indicam que o diluidor/diluição utilizado neste tratamento foi mais efetivo na manutenção da qualidade do sêmen. Os resultados indicam que como diluente de sêmen, o TQC Holding Plus<sup>®</sup> foi capaz de proteger a célula espermática.

Da mesma forma, associando-se o grau de vigor de  $2,08 \pm 0,51$  com a motilidade de  $43,33 \pm 11,55$ , obtidos no T1, pode-se inferir que este tratamento foi o que menos preservou a qualidade do sêmen. Resultados semelhantes foram verificados por Amirat et al. (2005), que no congelamento de sêmen bovino, com diferentes diluentes, observaram efeitos deletérios do diluente Tryladil<sup>®</sup> (tris-gema-glicerol). Os efeitos deletérios ocorreram ainda na fase de diluição do sêmen, sendo tais efeitos atribuídos a elevada concentração de gema de ovo (20%) presente no diluente. Embora a gema de ovo proteja a célula espermática dos danos ocorridos na refrigeração, congelação e descongelação, alguns de seus componentes foram tóxicos aos espermatozóides, ainda antes da congelação.

No presente experimento, embora não tenha sido verificado efeito deletério do Dilutris<sup>®</sup> logo após a diluição do sêmen, conforme referido por Amirat et al. (2005), o diluente foi menos efetivo ( $P < 0,05$ ) em manter a qualidade de sêmen (motilidade e vigor) do que o outro diluente testado. Além disso, como já referido por vários autores (FISER; FAIRFULL, 1984; FAHY, 1986; CRITSER et al., 1988; PARKS; GRAHAM, 1992; WOELDERS, 1997; KATKOV et al., 1998; AGCA; CRITSER, 2002), o glicerol presente no diluente, poderia exercer efeitos tóxicos sobre as células espermáticas e promover uma queda na qualidade do sêmen.

Na Tabela 3 estão apresentadas as taxas de gestação obtidas com inseminação artificial por via cervical superficial (IAC) e por laparoscopia (IAL), utilizando amostras de sêmen diluídas com dois diluentes comerciais. Verifica-se que, independentemente do diluente utilizado, os índices obtidos na IAL foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos obtidos pela IAC. Cabe ressaltar que existem diferenças metodológicas nos protocolos de sincronização quanto ao horário de retirada dos dispositivos intra-vaginais e a realização da inseminação artificial.

TABELA 3 - Taxa de gestação (%) de ovelhas submetidas à indução de estro sincronizado (60 mg de MAP por 13 dias e 400 UI de eCG no momento da retirada) e inseminadas pela via cervical superficial ( $100 \times 10^6$  de espermatozóides, volume da dose 0,05 mL) ou por laparoscopia ( $40 \times 10^6$  de espermatozóides, volume da dose 0,25 mL), 54 horas e 60 horas após a retirada de dispositivo intra-vaginal, respectivamente, com sêmen de carneiros diluídos com Dilutris<sup>®</sup> ou Holding<sup>®</sup>.

Método de Inseminação	Fresco	Dilutris	Holding	Total
Cervical	48,9 <sup>a</sup> (22/45)	28,6 <sup>B,b</sup> (14/49)	45,6 <sup>B,a,b</sup> (21/46)	33,6 <sup>B,b</sup> (47/140)
Laparoscopia	62,5 <sup>b</sup> (15/24)	72,7 <sup>A,a,b</sup> (16/22)	90,9 <sup>A,a</sup> (20/22)	75,0 <sup>A,a</sup> (51/68)
Total	53,6 <sup>a,b</sup> (37/69)	42,2 <sup>b</sup> (30/71)	60,3 <sup>a</sup> (41/68)	51,9 (108/208)

( ) Número de animais.

<sup>A,B</sup> letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna diferem (Qui-quadrado  $P < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup> letras minúsculas diferentes, na mesma linha diferem (Qui-quadrado  $P < 0,05$ ).

Estes resultados estão de acordo com vários autores (SALAMON; MAXWELL, 1995; HILL et al., 1998; DONOVAN et al., 1999; 2004; FAIR et al., 2005), que referiram que a IAL apresenta maiores índices de fertilidade quando comparada aos resultados da IAC, especialmente em protocolos que utilizam sêmen refrigerado/congelado. A IAL permite a suplantação da barreira física imposta pela condição anatômica da cérvix, o que permite a obtenção de elevados índices de concepção (BICUDO, 2003; SIMPLÍCIO, 2007; FONSECA; SIMPLÍCIO, 2008). No presente experimento, embora não tenha sido utilizado sêmen refrigerado/congelado, a deposição mais profunda do sêmen diluído também contribuiu para a obtenção de taxas mais elevadas de gestação.

O índice de gestação de 90,9% na IAL com sêmen diluído com o diluente TQC Holding Plus<sup>®</sup> foi significativamente superior ( $P > 0,05$ ) ao obtido com sêmen fresco (62,5%) e semelhante ao verificado com o diluente Dilutris<sup>®</sup> (72,7%). Estes índices demonstram que na técnica de inseminação por laparoscopia onde o sêmen é depositado diretamente no interior do útero, suplantando a barreira cervical, o diluidor Dilutris<sup>®</sup>

apresentou boa capacidade fecundante mesmo contendo glicerol na sua formulação. Na diluição do sêmen, além da possibilidade de aumentar o volume do ejaculado otimizando sua utilização, se visa suprir o espermatozóide de nutrientes para prolongar sua sobrevivência e manter sua atividade metabólica até o momento da fertilização (EVANS; MAXWELL, 1987). Os resultados demonstraram que na técnica de inseminação por laparoscopia a associação diluição/diluyente foi benéfica ao espermatozóide, suplementando-os dos nutrientes necessários por meio de seus componentes e mantendo uma boa capacidade fecundante dos espermatozoides possibilitando o uso de uma menor concentração espermática na dose inseminante.

Na técnica de inseminação cervical superficial a taxa de gestação obtida no grupo T3 (45,6%), inseminado com o diluyente TQC Holding Plus<sup>®</sup> foi semelhante ( $P>0,05$ ) a verificada no grupo que foi inseminado com sêmen fresco pela mesma técnica (48,9%). Já no grupo T1, que foi inseminado com Dilutris<sup>®</sup>, a taxa de gestação (28,6%) foi inferior ( $P<0,05$ ) à obtida com sêmen fresco. A taxa de 28,6% de gestação com Dilutris<sup>®</sup> indica que na IAC, na dose e concentração utilizadas no presente experimento, o diluyente não foi efetivo em proteger os espermatozoides, ocasionando baixos índices de concepção. Este resultado é semelhante ao observado na avaliação *in vitro* do sêmen, ao teste de TTR, e confirma a menor qualidade de sêmen ocorrida no T1. Podem ter contribuído para este resultado a menor taxa de diluição empregada para a produção das doses inseminantes, e ainda, a maior dificuldade na transposição da cérvice ovina, considerada como uma forte barreira para a população espermática na sua passagem ao interior do útero.

Também, a composição do diluyente pode não ter sido eficaz em proteger as células espermáticas, tendo em vista que a taxa de gestação do grupo inseminado com sêmen fresco foi superior à observada no grupo em foi que utilizado o diluyente Dilutris<sup>®</sup>, fato que não ocorreu com o outro diluyente.

Deve-se considerar, entretanto, que existe grande variação nos resultados médios de fertilidade obtidos na IAC em ovinos, dependendo do tipo de sêmen utilizado (fresco, diluído, refrigerado ou congelado) e na utilização ou não de sincronização do estro (FONSECA; SIMPLÍCIO, 2008). Assim, os resultados do presente experimento foram inferiores aos referidos por Greyling et al. (1994), que observaram taxas de concepção entre 65 e 75%, e de 73% na inseminação com sêmen fresco, em ovelhas com estro sincronizado e estro natural, respectivamente. Também são inferiores aos

relatados por Colas (1979), que observou índices de 65 a 70% de fertilidade em IAC, com sêmen refrigerado, em ovelhas com estro sincronizado.

O índice de 48,9% observado no presente experimento na IAC, com sêmen fresco e com estro sincronizado foi semelhante ao referido por Moraes et al. (2007) no RS. Os autores encontraram índices de não retorno ao estro (NR), entre 52 e 75%, em diferentes propriedades que utilizaram a IAC com sêmen fresco, em ovelhas sincronizadas com progestágenos e luteolíticos e em estro natural. Utilizando sêmen congelado e IAC, a média geral de NR nas mesmas propriedades foi de 22%. Os resultados obtidos são também semelhantes aos verificados por Barbas et al. (2002), que observaram índices de fertilidade que variaram de 28% a 47% na inseminação cervical, 55 h após a retirada dos dispositivos e com uma única dose, com sêmen diluído com diluente Tris (Trizma<sup>®</sup> Base) adicionado de 1,5 % de gema de ovo, e uma concentração de  $300 \times 10^6$  espermatozoides.

Com relação aos aspectos histológicos observados no tecido uterino, verificou-se que, independentemente do diluente utilizado, no período de seis horas após a IAL ocorreu uma reação inflamatória com infiltrado de neutrófilos, conforme o referido por Mattner et al. (1966), Katila (1995), Cotran et al. (1999), Troedsson et al. (2001) e Kaplanski et al. (2003).

Sendo a resposta inflamatória uma característica extremamente variável entre indivíduos, a não observação de infiltrado inflamatório de neutrófilos, nos cortes histológicos nos úteros das ovelhas do grupo controle pode estar relacionado a esta característica. Ainda pode estar relacionada ao diluidor utilizado, soro fisiológico, já que as concentrações e as doses inseminantes utilizadas foram idênticas para todos os grupos.

No útero das ovelhas que foram inseminadas com Dilutris<sup>®</sup> os cortes histológicos apresentaram um infiltrado inflamatório de neutrófilos, focal, de grau discreto a acentuado. Nas ovelhas inseminadas com o diluidor TQC Holding Plus<sup>®</sup> observou-se um infiltrado inflamatório de neutrófilos, focal, de grau ausente a moderado, conforme ilustrado na Figura 5.

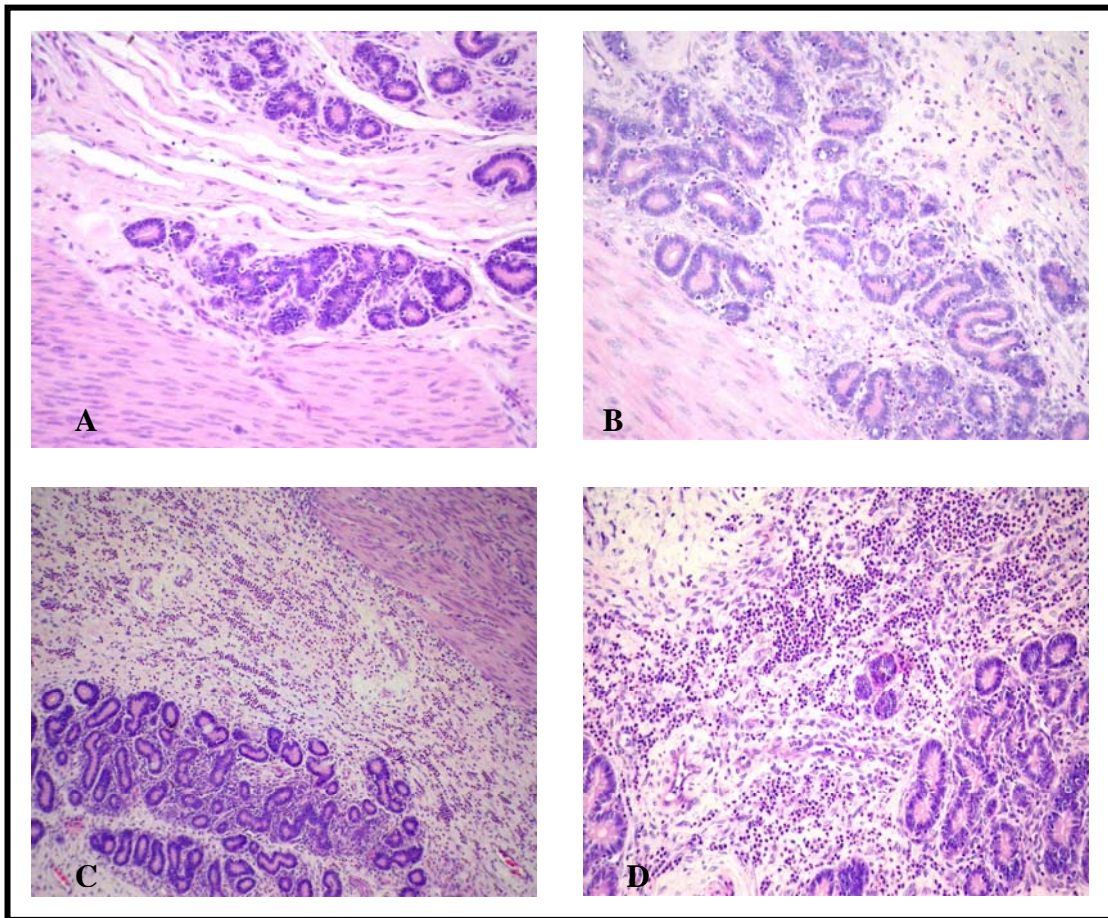


FIGURA 5 - Cortes histológicos do endométrio de ovelhas submetidas à inseminação artificial por laparoscopia (IAL) e coletados seis horas após a inseminação:

- A** - ausência de infiltrado inflamatório de neutrófilos (-), grupo controle, inseminação com sêmen fresco, utilizando soro fisiológico como diluidor;
- B** - infiltrado inflamatório de neutrófilos de grau discreto (+), inseminação com sêmen fresco, utilizando Dilutris<sup>®</sup> como diluidor;
- C** - infiltrado inflamatório de neutrófilos de grau moderado (++) , inseminação com sêmen fresco, utilizando Holding<sup>®</sup> como diluidor;
- D** - infiltrado inflamatório de neutrófilos de grau acentuado (+++), inseminação com sêmen fresco, utilizando Dilutris<sup>®</sup> como diluidor.

As respostas obtidas, em função do número de animais utilizados neste estudo, não são suficientes para estabelecer uma relação entre a intensidade da reação inflamatória intra-uterina e os índices de fertilidade obtidos com os diluidores empregados.

## 5 CONCLUSÕES

1 - O meio de manutenção de embriões TQC Holding Plus<sup>®</sup> demonstrou neste estudo que pode ser utilizado como diluidor de sêmen fresco de ovinos, tanto para inseminação artificial cervical superficial como para a inseminação intra-uterina por laparoscopia;

2 - O meio diluidor Dilutris<sup>®</sup>, pelos resultados obtidos neste estudo, pode ser utilizado como diluidor de sêmen fresco de ovinos para inseminações artificiais intra-uterina por laparoscopia;

3 - Nas condições deste estudo, a utilização do meio diluidor Dilutris<sup>®</sup> para inseminação artificial cervical superficial com sêmen fresco, com estro sincronizado com progestágenos, não se apresenta recomendável em função dos resultados obtidos;

4 – Um maior número de avaliações uterinas é necessário para a uma melhor constatação estatística da reação inflamatória uterina após a inseminação artificial por laparoscopia em ovelhas.



## REFERÊNCIAS

ACRITOPOLOU, S.; HARESIGN, W. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF<sub>2</sub>α given at different stages of the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 58, p. 219-221, 1980

ACRITOPOLOU, S. et al. Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of and analogue of prostaglandin F<sub>2</sub>α. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.49, p.337-340, 1977.

AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**. v. 20, n 1, p. 15-23, 2002.

AINSWORTH, L; SHRESTHA, J.N.B. Effect of type of intravaginal progestagen treatment on estrous response and reproductive performance of ewes. **Theriogenology**. v. 19, pp. 869–875, 1983.

AL-KAMALI, A.A. et al. Effects of progestagen type and PMSG source on lambing outcomes in ewes following artificial insemination. **Irish Veterinary Journal**, v. 43, p. 99-103, 1990.

ALIFAKIOTIS, T.; MICHAILEDIS, I; GAVRILIDIS, G. Induced breeding in anestrous milking ewes of dairy breeds: comparison of norgestomet, medroxyprogesterone and fluorogestone in two regimes of PMSG. **Theriogenology**, v. 17, p. 603–610, 1982.

ALVES, S.G.G. et al. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15. Porto Seguro, 2004. **Proceedings**. Porto Seguro: CBRA, 2004. p-p.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspect of epididymal physiology. **Journal Reproduction and Fertility**. 3, p. 260, 1962.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**. v. 7, p. 145-173, 1987.

AMARANTIDIS, I. et al. Efficiency of methods for estrous synchronization in indigenous Greek goats. **Small Ruminant Research**. v. 52, p. 247-252, 2004.

AMIRAT, L. et al Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**. v. 61, p. 895-907, 2004.

ANEL, L. et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction Domestic Animals**, 41 (suppl. 2), p. 30-42, 2006.

ANDERSON, J. **The semen of animals and its use for A.I.** Edinburgh, Tech. Com. Inp. Bur. Ab. and Genetics, 1945.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. Instituto FNP, Itaim – SP, p.340, 2007.

ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology** . v.19, p. 31-42, 1983.

ASHWOOD-SMITH, M. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B.J. (Ed.). **Temperature and animals cells**. Cambridge: Biologists, 1987. p. 395-406.

ASPACO. Associação Paulista de Criadores de Ovinos. Disponível em <http://www.aspaco.org.br> , acesso em: 10 jul. 2008.

AULETTA, F.J.; FLINT, A.P.F. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, non human primates and women, especially in relation to the time of luteolysis. **Endocrinology Reviews**, v. 9, p. 88-106, 1988.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in mammals**. n° 3. Hormones in reproduction. 1972, Cambridge, Cambridge Universid Press.

AYRES, M. et al. BioEstat 2.0 **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2000. 272p.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**. v. 82-83, p. 255-266, 2004.

BARBAS, J.P. et al. Influencia do diluidor, época e exploração, nos resultados de IA em ovelhas da raça Saloia. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**. [s.l.]: SPCV, 2002. p. 469-470.

BARREL, G. K. ; LAPWOOD, K. R. Seasonality of semen production and plasma luteinizing hormone, testosterone and prolactin levels in Romney, Merino and Polled Dorset rams. **Animal Reproduction Science**. v. 1, p. 213-218, 1979.

BARRET, D.M.W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of the eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**. v. 61, p. 311-327, 2004.

BARTLEWSKI, P.M. et al. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 113, p. 275-285, 1998.

BEDFORD, J.M. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: HANDBOOK OF PHYSIOLOGY, SECTION 7, ENDOCRINOLOGY, v. V. R.O. GREEP and E.B. ASTWOOD (Ed) **Male reproductive system**. Washington, D.C., American Physiological Society, 1975.

BERNDTSON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal Anatomy**. p. 140-167, 1974.

BICUDO, S. D. et al. Taxa de concepção no estro induzido com CIDR/eCG e no estro natural pós-indução/sincronização em programa de inseminação artificial de ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 26, p. 171-173, 2002.

BICUDO, S. D.; SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas suffolk. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.27, p. 473-474, 2003.

BISCHOF, R.J. et al. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. **Journal of Reproduction Immunology**. v. 26, p. 131-146. doi:10.1016/0165-0378(94)90036-1, 1994b.

BODIN, L.; ANJO, A. Use of artificial insemination in sheep production and genetics. In: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIAML, 48. **Proceedings**, [s.l.] 1997.

BONADONNA, T. **Le basi scientifiche e le possibilità applicative de la fecondazione artificiale negli animali domestici**, GiulioVanini (Ed)., v. I, Bescia, Italia, 1937.

BUCKRELL, B.C. et al. A breeding trial using a transcervical technique for artificial insemination in sheep. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. 12. Hague, Holland, 1992.

**Proceedings of the International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, SPCV, v. 3, p. 1531-1533.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2ª edição, Belo Horizonte, MG, 1998.

CLERMONT, Y. Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. **Exp. Cell. Research.** v 15, p. 438, 1958.

CLERMONT, Y.; BUSTOS-OBREGON, E. Reexamination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". **American Journal Anatomy.** 122, p. 237, 1968.

COELHO, L.A. et al. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. **Journal Pineal Research.** v. 41, p. 101-107, 2006.

COLAS, G. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induce oestrus and incidence of photoperiod on semen quality of the ram. **Livestock Production Science.** n. 21, p. 1-40, 1979.

CRITSER, J.K. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. III The effect of cryoprotectants on motility. **Fertility and Sterility.** v. 50, n. 2, p. 314-320, 1988.

CROSBY, T.F. et al. Effect of progestagen/progesterone treatment on the induction of pregnancy in ewes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND AI. 11. Dublin, 1988. **Proceedings of the International Congress Animal Reproduction and AI**, SPCV, v. 4, p. 428.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. "**Robbins pathologic basis of disease**". 6<sup>th</sup> Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA, 1999.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology.** v. 49, p. 831-841, 1997.

DAVIS, J.R.; LANGFORD, G.A.; KIRBY, P. **The testicular capsule; The testis.** A.D. Jonhson, Gomes, W.R. e Vandemark, N.L., 1:283, 1970.

DE, M.; CHOUDHURI, R.; WOOD, G.W. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. **Journal Leukocytic on Biology**. v. 50, p. 252-262, 1991.

DELIGIANNIS, C. et al. Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes. **Reproduction in Domestic Animal**. v. 40, p. 6-10, 2005.

DIMITROPOULUS, E. La signification du test de la thermoresistance das l'application de la valuer fecondante du sperme congelée. **Annales du Medecine Veterinaire**. v. 4, p. 215-224, 1967.

DIMITROPOULUS, E. Données actuelles sur les milieux de dilution du sperm du taureau et criteres d'appréciation de sa valuer fecondante avant et après la congelation. In: SEMINAIRE, 1972, Pisa. **Proceedings**. Italia, 1972.

DONOVAN, A. et al. Cervical AI with fresh and frozen-thawed semen: effect of ewe breed. **Irish Journal Agricultural Food Research**, v. 38, p. 267, 1999.

DONOVAN, A. et al. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**. v. 84, p. 35- 368, 2004.

DURAN DEL CAMPO, A. Extensión del ciclo estral y consideraciones al respecto. **Revista de Medicina Veterinaria del Uruguay**. Montevideo. v. 57, p. 29, 1959a.

DURAN DEL CAMPO, A. **Anatomia , fisiologia de la reproduccion e inseminacion artificial en ovinos**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1980. 264 p.

DURAN DEL CAMPO, A.; CAVESTANY, D.; HONTOU, G.D. **Manual practico de la reproducción e inseminacion artificial en ovinos**. Montevideo Hemisferio Sur, 1993. p. 167-170.

DURAN DEL CAMPO, A.; CASH, R. Sincronizacion de celo en ovinos mediante uso de prostaglandinas. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINARIA, 3. **Proceedings**. Uruguay, c. 345, 1982.

EDGAR, D.G.; RONALDSON, J.M. Blood levels of progesterone in the ewe. **The Journal of Endocrinology**. v. 16, p. 378, 1957.

EVANS, A.C.O. et al. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14 day progestagen estrus synchronization protocol in ewes.

**Theriogenology**. v. 56, p. 923-936, 2001.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salomon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney, Austrália, 1987, Butterworths & Co (Ed) Ltd., 1. ed.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza, Espanha, 1990, Acribia S.A.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**. v. 23, p. 1-13, 1986.

FAIR et al. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, v. 63, p. 1995–2005, 2005.

FECOLÃ – **Federação das cooperativas de lã do Brasil Ltda**. Criador gaúcho enfrenta dificuldades para vender safra de lã. Disponível em <http://www.arcoovinos.com.br/noticias>. Acesso em: 29 dez 2008.

FERREIRA, R.M. Dissertação de Mestrado. **Efeito da adição de antioxidante (Trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e ao meio de transporte de oócitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro**. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista, p. 137, 2008.

FIALA, S.M. et al. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**. n. 67, p. 556-562, 2007.

FILLAT, A. Inseminación artificial en ovinos. **Revista de la Asociacion de Ingenieros Agronomos**, Uruguay, n. 90, 1950.

FINDLATER, R.C.F. et al. Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen: effects of time of insemination and semen dose on conception rates. **Animal Production**. v. 53, p. 89-96, 1991.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**. v. 21, p. 542-551, 1984.

FLEMING, W.N.; OLAR, T.T.; MITCHEL, J.R. Thecniques for evaluation of brozen bovine semen at curtiss breeding service. In: TECHNOLOGYS CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION. 6. **Proceedings in the Technologys Conference on Artificial Insemination and Reproduction**. SPCV, p. 88-90, 1976.

FLYNN, J.D. et al. Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. **Animal Reproduction Science**. v. 62, p. 285-296, 2000.

FONSECA, J.F. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001.

FONSECA J.F. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.139-144, 2005.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.16, p.1-9, 2005.

FONSECA, J.F. et al. Induction of estrus in non-lacting dairy goats with different estrous synchronization protocols. **Animal Reproduction Science**. v. 85, p.117-124, 2005.

FONSECA, J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA – AMAZONPEC. I. **Anais**. 2008, Belém, Pará.

FOOTE, R.H.; CHEN, Y.; BROCKETT, C.C. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. **Journal Dairy Science**. v. 76, p. 1908-1913.1993.

FOOTE, R.H. Extenders and extension of unfrozen semen. In: SALISBURY, G.L., VANDEMARK, N.L., LODGE, J.R. (Ed). **Physiology of Reproduction – Artificial Insemination of Cattle**. Freeman, San Francisco, pp. 442-493, 1978.

FOOTE, R.H.; BRATTON, R.W. Survival of bovine spermatozoa stored at 5 and 25°C in extenders containing varying levels of egg yolk, glucose, glycine, glycerol, citrate and others salts. **Journal of Dairy Science**. v. 43, p. 1322-1329, 1960.

GALLOWAY, D. B. Reproduction in the ram. In: REFRESHER COURSE FOR VETERINARIANS. **Sheep production and preventive medicine**. Sydney, Australia, p. 163-195, 1983.

GALLOWAY, D. B. Reproduction in the ram: Part 1. Normal reproductive function. **Australian Research Community**. n.9, p. 1-18, 1972.

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

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Intraovarian relationship among dominante and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**. v. 32, p. 787-795, 1989.

GINTHER, O.J.; KOT K.; WILTBANK M.C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrus cycle in ewes. **Theriogenology**. v. 43, p. 689-703, 1995.

GIRÃO, R. N. **Produção de sêmen em carneiros da raça Corriedale mantidos em foto-período e temperaturas naturais e controlados**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRGS, Porto Alegre. 1982.

GODFREY, R.W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of estrous synchronization of hair sheep in the tropics. **Animal Reproduction Science**. v. 47, p. 99-106, 1997.

GORDON, I. Induction of early breeding in sheep by standard and modified progestagen-PMS treatments. **Journal of Agricultural Science**. v. 76, p. 337-341, 1971b.

GORDON, I. **Controlled reproduction in sheep and goats**. Cambridge, UK at the University Press, 450 p., 1997.

GRAY, C.J. Glycoprotein ganadotropins. Structure and synthesis. **Acta Endocrinology Supplement**. v. 288, p.20-27, 1988.

GREYLING, J.P.C. et al. Synchronization of oestrus in sheep: Use of different doses of progestagen outside the normal breeding season. **South African Journal of Animal Science**. v. 24, p. 33, 1994.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. Manole, Quarta edição, c. 5, p. 95-127, 1982.



- HANSSON, V. et al. Androgen transport and receptor mechanisms in the testis and epididymis. In: HANDBOOK OF PHYSIOLOGY, SECTION 7, ENDOCRINOLOGY, v. V. **Male reproductive system**. R.O. GREEP and E.B. ASTWOOD (Ed), Washington, D.C., American Physiological Society, 1975.
- HARVEZ, T.G. et al. Artificial insemination in sheep: comparison of storage time, dose rate and insemination technique. **Proceedings of the New Zealand Society of the Animal Production**. v. 46, p. 229, 1986.
- HILL, J.R.; THOMPSON, J.A.; PERKINS, N.R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 merino ewes under commercial conditions: a survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 697-709, 1998.
- HOCHEREAU de REVIERS, M.T.; COUROT, M.; ORTAVANT, R. Marquage des cellules germinales du Bèlier et du Taureau par injection de thymidine tritiée dans L'Artère spermatique. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.** 4, 157, 1964.
- HOCHEREAU de REVIERS, M.T. **Etudes des divisions spermatogoniales et du renouvellement de la spermatogonic souche chez le taureau**. Doctoral Science Thesis, University of Paris, Paris, 1970.
- HOLLINSHEAD, F.K. et al. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Reproduction of Fertility Development**. v.14, p. 503-508, 2002.
- HOUGHTON, J.A.S. et al. Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. **Journal of Animal Science**. v. 73, p. 2094-2101, 1995.
- HUTCHINSON, J.S.M.; ROBERTSON, H.A. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. **Research in Veterinary Science**. v. 7, p. 17, 1966.
- IGUMA, L.T. et al. Development of bovine embryos reconstructed by nuclear transfer of transfected and non-transfected adult fibroblast cells. **Genetics and Molecular Research**. n. 4, v. 1, p. 55-66, 2005.
- INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Censo Agropecuário**. Efetivo de animais por tipo de rebanho. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 05 nov. 2008.
- JAINUDEEN M.R.; WAHID H.; HAFEZ E.S.E. **Reprodução animal**. Manole, 7<sup>a</sup> Edição, cap.12: Ovinos e Caprinos, p. 173-182, 2004.

JEYENDRAN, R.S. et al. Development of assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 70, p. 219-228, 1984.

JONES, R.T.; MARTIN, I.C.A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastruture of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 35, p. 311-320, 1973.

JONHSON, S.K et al. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 13, p. 69-79, 1996.

KAPLANSKI, G. et al. IL-6: a regulador of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunology**. v. 24, p. 25-29. doi:10.1016/S1471-4906(02)00013-3, 2003.

KARROW, A.M. Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. **Xytex Corporation**. Disponível em <http://www.xytex.com/cryobiology>. Acesso em 20 dez 2008.

KARSCH, F.J. et al. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. **Rec. Prog. Horm. Res.** v. 40, p. 185-223, 1984.

KARSCH, F.J. et al. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. **Reproduction, Nutrition and Development**. v.28, p.459-472, 1988.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammation response of mares with fresh semen. **Biology of Reproduction**. Mono 1, p. 515-7, 1995.

KATKOV, I.I. et al. Mouse spermatozoa in hight concentrations of glycerol. Chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. **Cryobiology**. v. 37, p. 325-338, 1998.

KAUSHIC, C. et al. Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. **American Journal of Reproduction Immunology**. v. 39, p. 209-216, 1998.

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

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**. v. 41, p. 629-636. doi:10.1016/0093-691X(94)90173-G. 1994.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**. v. 39, p. 1279-1289, 1993.

LARREA, L. Contribucion al studio de la inseminacion artificial en ovinos. **Revista de la Asociación de Ingenieros Agronomos**. Uruguay, p. 6, 1944.

LASLEY, J.F.; EASLEY, G.T.; MCKENZIE, F.N. Staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. **Anatomy Record**. 82:167, 1942.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Animal New York Academy of Science**. v. 55, p. 548, 1952.

LEGAN, S.J. et al. Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycle in anestrus ewe. **Endocrinology**. v. 117, p. 1530-1536, 1985.

LINCOLN, G.A.; MAEDA, K.I. Reproductive effects of placing microimplants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in ram. **Journal of Endocrinology**. v.132, p.201-215, 1992.

LINO, B.F.; BRADEN, A.W.H.; TURNBULL, K.E. Fate of unejaculated spermatozoa. **Nature**. v. 213, p. 594, 1967.

LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLO, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. **Theriogenology**. v. 55, p. 1797-1805, 2001.

LUTHER, J.S. et al. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. **Small Ruminant Research**. 2006. Disponível em: <10.1016/j.smallrumres.2006.10.015>. Acesso em: 05 nov 2008.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research on Animal Science**. v. 37, p.10-18, 2000.

MALPAUX, B. et al. Short days effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. **Biology of Reproduction**. v.48, p.752-760, 1993.

MANN, T. **The biochemistry of semen**. London, Methuen, 1954.

MARSHALL, C.; FREY, L. Semen evaluation at select sires. In: TECHNOLOGYS CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 6. **Proceedings of the technologys conference on artificial insemination and reproduction**. SPCV, [s.l.], p. 91-93, 1976.

MARTIN G.B. et al. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. **Animal Reproduction Science**. v. 82-83, p. 231-45, 2004.

MATTHIJS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. **Reproduction**. v. 125, p. 357-367. doi:10.1530/REP.0.1250357, 2003.

MATTNER, P.E. Spermatozoa in the genital tract of the ewe: II. Distribution after coitus. **Australian Journal of Biological Science**. v. 16, p. 688-694, 1963.

MATTNER, P.E. Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. **Nature**. v. 212, p. 1479-1480, 1966.

MATTNER, P.E. Differential leukocyte responses to spermatozoa in the cervix and the uterus in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 18, p. 297-303, 1969.

McMASTER, M.T. et al. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. **Journal of Immunology**. v. 148, p. 1699-1705, 1992.

MAXWELL, W.M.C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of insemination on fertility. **Animal Reproduction Science**. v. 10, p. 309-316, 1986b.

McDONALD, L. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6<sup>a</sup> edição, cap. 34: Hormônios da hipófise, p. 464-473, 1992.

McKENZIE, F.F.; TERRIL, C. Oestrus, ovulation and related phenomena in the ewe. **Research Biology**. University of Missouri, USA, p. 264, 1966.

MELO, A.C.M.; NUNES, J.F. Utilização da água de côco e do leite glicosado como diluente para a congelação do sêmen caprino. In: ANAIS DO IX CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. v. 2. **Proceedings**. Belo Horizonte, CBRA, p. 435, 1991.

MELO, M.I.V. **Teste hipoosmótico na avaliação do sêmen equino**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, p. 67, 1999.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on the length of the ovulatory cycle of goats. **Animal Reproduction Science**. v. 68, p. 69-76, 2001.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 post-ovulation in goats. **Theriogenology**. v. 58, p. 1713-1721, 2002.

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

MERGULHÃO, F.C.C. et al. Influência do protocolo de sincronização sobre a duração do estro de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.27, n.3, p.485-486, 2003.

MIES FILHO, A. Alguns aspectos da esterilidade ovina. **Anais da Biblioteca da Sociedade Paulista Medicina Veterinária**. n. 9, p. 119-138, 1956.

MIES FILHO, A.; RAMOS, A. Ciclo estral de ovelhas no Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, 1960.

MIES FILHO, A.; BLAUT, S.; PADILHA, S.F. Inseminação artificial em gado de corte com sêmen congelado no Brasil. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS**, v. 6, p. 197-202, 1964.

MIES FILHO, A. et al. Variação estacional da morfologia espermática de ovinos da raça Corriedale. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, n.7, p. 121-134, 1979.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Sulina, 5ª Edição, 2º Volume, 1982.

MIHM, M. et al. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.116, p.293–304, 1999.

MINTON, J.E.; COPPINGER, T.R.; SPAETH, C.W. Poor reproductive response of anestrus Suffolk ewes to ram exposure is not due to failure to secrete luteinizing hormone acutely. **Journal of Animal Science**. v.69, p.3314-3320, 1990.

MITCHELL, S.E. et al. Interleukin 8 in the cervix of non-pregnant ewes. **Reproduction**. v. 124, p. 409-416. doi:10.1530/Rep.0.1240409, 2002.

MOBINI S.; HEATH A.M.; PUGH D.G. **Sheep and goat medicine**. Pennsylvania – Estados Unidos: W.B. SAUNDERS COMPANY, cap. 6: Theriogenology of sheep and goats, p. 129-196, 2002.

MORAES, J.C.F.; OLIVEIRA, N.M. Efeitos ambientais sobre o tamanho testicular e a produção espermática em carneiros Romney Marsh e as implicações de seu emprego na seleção precoce de reprodutores In: ANAIS DO X CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Proceedings**, CBRA, Belo Horizonte, p. 343, 1993.

MORAES J.C.F.; SOUZA C.J.H.; GONÇALVES P.B.D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. 340p Cap.3: Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos, p.25-55.

MORAES J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; JAUME, C.M. Um sistema para uso do sêmen ovino congelado via cervical superficial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17. 2007, Curitiba, PR, **Anais...**Belo Horizonte, CBRA, 2007, p. 147.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. v. 57, n. 1, p. 1695-706, 2002.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H.T. **Cryobiology**. London, New York, Academic Press, p. 179-220, 1966.

NOEL, B. et al. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. **Theriogenology**. v. 41, p. 719-727, 1994.

OBERST, E.R. et al. Teste hipoosmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

O'LEARY, S. et al. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**. v. 128, p. 237-247. doi:10.1530/REP.1.00160, 2004.

ORGBIN-CRIST, M.C. Recherches experimentales sur la durée de passage des spermatozoides dans l'épididyme du taureau. **Ann. Biologic Animal and Biochimic and Biophysic**. v. 2, p. 51. 1962.

ORTAVANT, R.; THIBAUT, C. Influence de la durée d'éclairment sur les productions spermatiques du bélier. **C. R. Society Biology**. n. 150, p. 358-361, 1956.

ORTAVANT, R. 1959. Déroulement et du cycle spermatogénétique chez le belier. **Ann. Zootechnic**. 8, 183, 271.

ORTAVANT, R. Responses spermatogénétiques du 'belier à différentes durées d'éclairment. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. Hague. **Proceedings**. SPCV, p. 236-242, 1961.

OTTO DE SÁ, C.; SÁ, J.L. História dos ovinos. Disponível em <http://www.crisa.vet.br/história>. Acesso em: 20 de nov. 2008.

PANDYA, I.J.; COHEN, J. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. **Fertility and Sterility**. v. 43, p. 417-421, 1985.

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

PAULENZ, H. et al. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. **Theriogenology**. v. 61, p. 1719-1727, 2004.

PAULENZ, H. et al. Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. **Veterinary Reproduction**. v. 156, p. 372-375, 2005.

PHILLIPS, P.H., LARDY, H.A. A yolk buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**. v. 23, p. 399-404, 1940.

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

PROPHET, E. B. et al. **AFIP laboratory methods in histotechnology**. Washington, American Registry of Pathology, 1994. 274 p.

RAHMANIAN, M.S.; MURDOCK, W.J. Function of ovine corpora lutea after administration of luteinizing hormone-releasing hormone. **Journal of Animal Science**. v. 64, p. 648-655, 1987.

RIBEIRO, L.A.O.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Prenhez em rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 32, n. 4, p. 637-641, 2002.

RIBEIRO JÚNIOR, I. **Análises estatísticas no SAEG**. Vinosa, UFV, 2001. 301p.

RIET, J.; ETCHENIQUE, L.; JAUNSOLO, D. La inseminacion artificial y sus posibilidades en el Uruguay. **Boletin de direccion de ganaderia**. 1938.

ROBERTS, S.J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. Michigan, (Ed) BROTHERS, Inn. Ann Arbor, 2ª Edition, 1971. p. 776.

ROBERTSON, S.A. **Reproduction in domestic animals**. 3th Edition, cap. 18: Reproduction in the ewe and the goat, p. 475-498, 1977.

ROBERTSON, S.A. et al. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. **American Journal of Reproduction and Immunology**. v. 37, p. 438-442, 1997.

ROBERTSON, S.A. et al. Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. **Journal Reproduction and Fertility**. v. 107, p. 265-277, 1996.

ROBERTSON, J.G.; RAKHA, A.M. Time of onset of oestrus in the ewe. **Journal Reproduction on Fertility**. v. 10, p. 271, 1965.

ROBINSON, T.J. Synchronization of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**. v. 8, p. 47-49, 1964.



ROTA, A. et al. Hypoosmotic swelling (HOST) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**. v. 53, p. 1415-1420, 2000.

ROUSSEL, J.D., STALLCUP, O.T., AUSTIN, C.R. Selective phagocytosis of spermatozoa in the epididymis of bull, rabbits and monkeys. **Fertility and Sterility**. 18:509, 1967.

ROZEBOOM, K.J. et al. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. **Journal of Animal Science**. v. 77, p. 2201-2206, 1999.

RUBIANES, E. et al. Reproductive performance of a new timed artificial insemination protocol (Synchrovine<sup>TM</sup>) in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 16, p. 508, 2004.

RUBIANES, E., MENCHACA, A., CARBAJAL B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . **Animal Reproduction Science**. v. 78, p. 47-55, 2003.

RUBIANES, E., MENCHACA, A., CARBAJAL B. Response to PGF<sub>2</sub> $\alpha$  during the early luteal phase of the ewe. **Proceedings of the International Embryo Transfer Society**. Foz do Iguaçu, Brasil, 2002.

RUBIANES E., UNGERFELD, R.; MENCHACA, A. Bases fisiológicas de la sincronización de celos em ovinos y algunas técnicas de manejo. **Arquivos de la Facultad de Veterinaria**. Universidad de Montevideo, Uruguay. 2002.

RUBIANES, E., UNGERFELD, R. Perspectivas de la investigación sobre reproducción ovina en América Latina en el marco de las actuales tendencias productivas. **XVI Reunión de ALPA**. Montevideo, Uruguay. 2002.

RUBIANES E. Nociones básicas da fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: **Anais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**. p. 255-282, 2000.

RUBIANES, E., CASTRO, T., KMAID, S. Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. **Theriogenology**. v.49, p.356, 1998.

RUBIANES, E., CASTRO, T., CARBAJAL, B. Effects of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. **Journal of Animal Science**. v. 76, p. 473-475, 1996.

SAACK, R.G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In: **TECHNOLOGYS CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION**. 3. p.17-30, 1970.

SHACKELL, G.H.; KYLE, B.; LITTLE JONH, R.P. Factors influencing the success of a large scale artificial insemination program in sheep. **Procedures of New Zeland Society Animal**. v. 50, p. 427-430, 1990.

SALGUEIRO, C.C. de M. et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 27, n. 3, 2003.

SALISBURY, G.W., VanDEMARK, N.L. **Fisiologia de la reproduccion y inseminacion artificial en los bovinos**. 1964, p. 707.

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. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**. v. 62, p. 77-111, 2000.

SALLES, M.G.F.; NUNES, J.F. Avaliação “in vitro” do sêmen caprino diluído em água de coco “in natura” e adicionada de citocinina. In: ANAIS DO X CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Proceedings**. CBRA, Belo Horizonte, MG, v. 2, p. 347, 1993.

SANFORD, T.R.; DE, M.; WOOD, G.W. Expression of colony-stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus of CD1 mice during days 1 to 3 pregnancy. **Journal Reproduction and Fertility**. v. 94, p. 213-220, 1992.

SANTOS, A.D.F. et al. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, n. 3, 2001.

SCOTT, J.L.; KETHEES, N.; SUMMERS, P. Leukocyte population changes in the reproductive tract of the ewe in response to insemination. **Reproduction of Fertility and Development**. v. 18, p. 627-634, 2006.

SENGER P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2<sup>a</sup> ed. USA: Cadmus Professional Communications. Cap. 7, p. 368. Reproductive Cyclicity – Terminology and Basic Concepts, p.144 – 163, 1999.

SETCHELL, B.P. **Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. In the Testis**. v. 1. A.D. JOHNSON, W.R. GOMES and N.L. VANDEMARK (Ed). New York, Academic Press, 1970, p. 101, 230.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 234-246, 2007.

SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 79, p. 99-103, 1987.

SMITH, P.L. et al. Equine lutropin and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO<sub>4</sub>-4-GalNAc and Siaα<sub>2</sub>, 3 Gal, respectively. **Journal Biology Chemical**. v. 268, p. 795-802, 1993.

SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. **Biology of Reproduction**. v. 56, p. 483-488, 1997.

SOUZA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer<sup>®</sup> na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizadas de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. Botucatu. 2002. Tese (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

SOUZA, R.V. **Efeito da micromanipulação para a identificação do sexo sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, p. 47, 2007.

SWANSON, E.W., BEARDON, A.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**. 10:981, 1951.

SWIERSTRA, E.E.. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of the spermatozoan transit through the epididymis. **Anat. Rec.** p. 161-171, 1968.

SWIERSTRA, E.E., GENAUER, M.R., PICKETT, B.W. Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 40, p. 113. 1974.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolos de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2004.

TRALDI, A.S. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. **Anais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. USP, 2000.

TREMELLEN, K.P.; SEAMARK, R.F.; ROBERTSON, S.A. Seminal transforming growth factor beta-1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. **Biology Reproduction**. v. 58, p. 1217-1225. doi:10.1095/BIOLREPROD58.5.1217, 1998.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**. v. 68, p. 273-278, 2001.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**. v. 50, p. 1217-1225, 1998.

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. **Animal Science**. v. 68, p. 349-353, 1999.

VIÑALES, C. **Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe**. Doctoral thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Uppsala, 2003.

VIÑALES, C. et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**. v. 55, p. 993-1004, 2001.

VIÑALES, C. et al. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in the ewe. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14. **Proceedings of the International Congress on Animal Reproduction**, Stockholm, July, 1:26, 2000.

VIÑALES, C. et al. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**. v. 51, p. 1351-1361, 1999.

WEBSTER, A. Infertility in rams. **Procedures of the New Zeland Animal Production**. 1951.

WHEATON, J.E. et al. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**. v. 33, p. 127-141, 1993.

WILTBANK, M. C.; NISWENDER G. D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. **Animal Reproduction Science**. v. 28, p.103-138, 1992.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**. v. 19, n. 3, p. 135-8, 1997.

ZARKAWI, M. Monitoring the reproductive performance in Awassi ewes using progesterone radioimmunoassay. **Small Ruminant Research**. v. 26, p. 291-294, 1997.