

KAREN MARTINS LEÃO

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM ÉGUAS UTILIZANDO UM BAIXO NÚMERO DE
ESPERMATOZÓIDES**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Campus de Botucatu para a obtenção do
título de Doutora em Medicina Veterinária área de
Reprodução Animal

Orientador: Prof. Adj. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu-SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Leão, Karen Martins.

Avaliação de diferentes técnicas de inseminação artificial em éguas utilizando um baixo número de espermatozoides / Karen Martins Leão. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Equino – Reprodução 2. Inseminação artificial 3. Sêmen
CDD 636.10824

Palavras-chave: Baixa dose; Equino; Sêmen congelado; Técnicas de inseminação; Transporte espermático; Viabilidade espermática

Ao **Robertinho** (in memorian), meu esposo,
que foi e sempre será o meu grande amor, por todo o
seu apoio, ajuda e dedicação e também por ter
permitido eu viver ao seu lado grande parte de sua vida.

*“O valor das coisas não está no tempo em que duram,
mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis.”*

*Aos meus pais, **Lázaro** e **Elizabeth**, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e principalmente pela força, que hoje sustenta a minha existência.*

*À toda **minha família**, que mesmo distante estiveram sempre presente, pelo amor, carinho e constante incentivo.*

*Ao **Prof. Marco**, meu orientador, por todas as oportunidades que me ofereceu, amizade e principalmente pela paciência na etapa final deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho, amizade e pelo constante apoio e incentivo.

Ao Prof. Marco Antonio Alvarenga pela orientação e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela confiança, amizade e oportunidades profissionais que me ofereceu.

À Profa. Fernanda, pela amizade e por toda ajuda durante a minha pós-graduação.

Ao Prof. Papa, pela amizade e principalmente pela sua participação na minha formação profissional.

Aos professores do departamento de Reprodução Animal da UNESP-Botucatu Nereu, João, Meira, Denise, Eunice e Sony, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Nicolau, pelo exemplo profissional, confiança, amizade, apoio e principalmente pelo constante incentivo.

À Profa. Regina Kiomi Takahira e todos aos residentes de 2003 / 2004 do laboratório de patologia clínica da FMVZ – UNESP – Botucatu, pela realização das análises do experimento 4 deste trabalho.

À Profa. Lídia, do departamento de Bioestatística da UNESP – Botucatu, pelo auxílio nas análises estatísticas

Ao Dito, pela dedicação, apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho, que foram fundamentais e principalmente pelos ensinamentos e grande amizade.

Aos funcionários Edilson, Marquinho, Walter, Christina, Marcio, Tico e Miguel, por todas as colaborações, que foram fundamentais.

Aos estagiários que me acompanharam durante o desenvolvimento deste trabalho, pela ajuda, que foi de grande importância.

Ao Prof. Nogueira, da Universidade Federal de Pelotas, pela grande colaboração.

Ao Frigorífico Miramar, onde realizei parte deste trabalho.

Aos amigos Fred, Bruna e alunos da graduação da Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio e grande colaboração.

Aos amigos Alexandre Rocha, Gustavo e Karen Perez, pela ajuda e amizade

Ao Robertinho (*in memoriam*), pelo constante apoio e incentivo.

Ao Seu Valtinho, Dona Zenaide, Renato e Rogério, que fazem parte da minha família, obrigada pelo apoio e principalmente pelo carinho.

Às minhas irmãs Christiane e Débora, pelo apoio, paciência e grande amizade.

Aos meus novos amigos Viviam, Vanessa, Cristina, Rafael, Tito e Zé Filho, pela amizade e apoio, que foi muito importante nesta etapa final.

À Janine, uma grande amiga, pela dedicação, apoio, incentivo e principalmente pela sua importante participação neste trabalho.

Aos amigos Bigu, Letícia, Marcelo, Elen, Milena, Luciano e Claudinha, obrigada por tudo que passamos juntos, vocês serão eternos em minha lembrança.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro. Processo: 02/00879-8

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Técnica utilizada para lavagem dos ovidutos60
- Figura 2. Valores médios da celularidade do líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intraperitoneal entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses102
- Figura 3. Valores médios da porcentagem de neutrófilos no líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intraperitoneal entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses.....102
- Figura 4. Valores médios da celularidade do líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intrafolicular entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses103
- Figura 5. Valores médios da porcentagem de neutrófilos no líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intrafolicular entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses.....103

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Média e desvio padrão referentes à variável porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (FLU) logo após a descongelação ou diluição (T0) e às variáveis porcentagem de espermatozóides mortos com a membrana acrossomal íntegra (MI), porcentagem de espermatozóides mortos com acrossoma reagido (MR) e porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra (VI) uma hora após a descongelação ou diluição (T1), segundo os grupos I, II e III.....69
- Tabela 2. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de motilidade total (MT) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.....70
- Tabela 3. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de motilidade progressiva (MP) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.....71
- Tabela 4. Média e desvio padrão referentes à velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP - $\mu\text{m/s}$) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.....72
- Tabela 5. Média e desvio padrão referentes à velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea (VSL - $\mu\text{m/s}$) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.....73
- Tabela 6. Média e desvio padrão referentes à velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL - $\mu\text{m/s}$) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.....74

- Tabela 7. Média e desvio padrão referentes ao deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.....75
- Tabela 8. Média e desvio padrão referentes à frequência dos batimentos flagelares (BCF - Hz) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição76
- Tabela 9. Média e desvio padrão referentes ao índice retilíneo (STR - %) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição77
- Tabela 10. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de linearidade (LIN) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição78
- Tabela 11. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de espermatozóides com movimento rápido (RAP) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição79
- Tabela 12. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis na extremidade do corno uterino (IAPC), grupo GIB, com sêmen congelado do garanhão A.....81
- Tabela 13. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia (IAH), grupo GIC, com sêmen congelado do garanhão A.....81

- Tabela 14. Número de espermatozóides encontrados no lavado dos ovidutos direito e esquerdo das éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero (IACU), grupo GID, com sêmen congelado do garanhão A.....82
- Tabela 15. Número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, dos grupos GIA, GIB, GIC e GID, realizados na Parte I do experimento 2, em que as éguas foram inseminadas com sêmen congelado do garanhão A.....82
- Tabela 16. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis na extremidade do corno uterino (IAPC), grupo GIIB, com sêmen fresco do garanhão B.....84
- Tabela 17. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia (IAH), grupo GIIC, com sêmen fresco do garanhão B.....85
- Tabela 18. Número de espermatozóides encontrados no lavado dos ovidutos direito e esquerdo das éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero (IACU), grupo GIID, com sêmen fresco do garanhão B.....85
- Tabela 19. Número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, dos grupos GIIA, GIIB, GIIC e GIID, realizados na Parte II do experimento 2, em que as éguas foram inseminadas com sêmen fresco do garanhão B86
- Tabela 20. Número total de ovidutos avaliados, número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, das éguas inseminadas com sêmen congelado e fresco do garanhão B, utilizando diferentes técnicas de inseminação87

- Tabela 21. Número de ovidutos que continham espermatozóides e número médio de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando apenas os ovidutos em que foram encontrados espermatozóides, das éguas inseminadas com sêmen congelado e fresco do garanhão B, utilizando diferentes técnicas de inseminação.....88
- Tabela 22. Número total de ovidutos avaliados, número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, das éguas inseminadas com sêmen congelado do garanhão A e com sêmen congelado do garanhão B, utilizando diferentes técnicas de inseminação.....89
- Tabela 23. Número de espermatozóides recuperados três horas após inseminações intrafoliculares (IAIF) *in vitro*, em folículos de 35 a 40 mm de diâmetro, com 20×10^6 espermatozóides móveis, oriundos de sêmen congelado de um garanhão da raça árabe utilizado na parte I deste experimento90
- Tabela 24. Porcentagem de éguas prenhes inseminadas pelo método convencional (IACU), na extremidade do corno uterino ipsilateral à ovulação (IAPC), por histeroscopia (IAH), deposição do sêmen dentro do folículo pré-ovulatório (IAIF) e deposição do sêmen sobre o ovário contendo um folículo pré-ovulatório (IAIP).....91
- Tabela 25. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intraperitoneal, segundo os momentos zero (GIP0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intraperitoneal (GIP6).....93
- Tabela 26. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intraperitoneal, segundo os momentos zero (GIP0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intraperitoneal (GIP6)93

- Tabela 27. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intrafolicular, segundo os momentos zero (GIF0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intrafolicular (GIF6).....95
- Tabela 28. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intrafolicular, segundo os momentos zero (GIF0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intrafolicular (GIF6)95
- Tabela 29. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal 6 horas após as inseminações dos grupos em que foram realizados inseminação intraperitoneal (GIP6) e inseminação intrafolicular (GIF6)96
- Tabela 30. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Man-Whitney e valor de p para as variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilo do líquido peritoneal 6 horas após as inseminações dos grupos em que foram realizados inseminação intraperitoneal (GIP6) e inseminação intrafolicular (GIF6).....97
- Tabela 31. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo controle em diestro, no qual as éguas não foram inseminadas e nem ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GC0) e 6 horas após (segunda paracentese, GC6)98

- Tabela 32. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo controle em diestro, no qual as éguas não foram inseminadas e nem ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GC0) e 6 horas após (segunda paracentese, GC6).....99
- Tabela 33. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo controle ovulação, no qual as éguas não foram inseminadas, mas ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GCO0) e 6 horas após (segunda paracentese, GCO6).....100
- Tabela 34. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo controle ovulação, no qual as éguas não foram inseminadas, mas ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GCO0) e 6 horas após (segunda paracentese, GCO6)101
- Tabela 35. Porcentagem de éguas prenhez inseminadas por inseminação intrafolicular (IAIF), pelo método convencional (IACU) com sêmen fresco de jumento concomitantemente com a inseminação intrafolicular (IAIF) utilizando sêmen congelado de garanhões e éguas inseminadas pelo método convencional (IACU) apenas com sêmen fresco de jumento.....104

LISTA DE ABREVIATURAS

- hFF** – Fluido folicular humano
- GIFT** – Transferência intrafalopiana de gametas
- MT** – Motilidade total
- MP** – Motilidade progressiva
- VAP** – Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média
- VCL** – Velocidade espermática ao longo de uma trajetória real
- VSL** – Velocidade espermática ao longo de uma trajetória retilínea
- LIN** – Linearidade
- RAP** – Espermatozóides com movimento rápido
- ALH** – Deslocamento lateral da cabeça
- BCF** – Frequência de batimentos flagelares
- STR** – Índice retilíneo
- IMP** – Integridade de membrana plasmática
- MI** – Espermatozóides mortos com membrana acrossomal íntegra
- MR** – Espermatozóides mortos com membrana acrossomal reagida
- VI** – Espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra
- CASA** – Análise computadorizada
- HTF** – Fluido tubárico humano
- IACU** – Inseminação artificial no corpo do útero
- IAPC** – Inseminação artificial na extremidade do corno uterino
- IAH** – Inseminação artificial histeroscópica
- IAIP** – Inseminação artificial intraperitoneal
- IAIF** – Inseminação artificial intrafolicular
- GnRH** – Hormônio liberador de gonadotrofina
- PGE₂** – Prostaglandina E₂
- hCG** – Gonadotrofina coriônica humana
- hMG** – Gonadotrofina menopausal humana

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Efeitos do fluido folicular sobre a viabilidade espermática	22
2.2. Transporte espermático	26
2.3. Técnicas de inseminação artificial	33
2.4. Líquido peritoneal	51
3. MATERIAL E MÉTODO	56
3.1. EXPERIMENTO 1 – Avaliação da viabilidade do sêmen congelado de garanhões, quando diluído em fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de éguas	56
3.1.1. Avaliações do movimento espermático	56
3.1.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática	57
3.1.3. Avaliação da reação acrossomal	57
3.1.4. Análise estatística	58
3.2. EXPERIMENTO 2 – Avaliação da população espermática no oviduto de éguas após a inseminação artificial, utilizando diferentes técnicas de inseminação com sêmen fresco e congelado de garanhões	58
3.2.1. Parte I – Avaliação da população de espermatozóides no oviduto de éguas inseminadas com diferentes técnicas de inseminação, com sêmen congelado do garanhão A	61
3.2.2. Parte II – Avaliação da população de espermatozóides no oviduto de éguas inseminadas com diferentes técnicas de inseminação, com sêmen fresco e congelado do garanhão B	61
3.2.3. Metodologia utilizada para a realização das inseminações da parte I e II do experimento 2	62
3.2.4. Parte III – Avaliação da recuperação espermática após inseminações intrafoliculares (IAIF), <i>in vitro</i> , com sêmen congelado do garanhão A	63
3.3. EXPERIMENTO 3 – Teste de fertilidade de diferentes técnicas de inseminação artificial utilizando um baixo número de espermatozóides	64
3.3.1. Metodologia utilizada para execução das inseminações do experimento 3	65

3.4. EXPERIMENTO 4 – Avaliação da reação inflamatória causada na cavidade peritoneal, após as inseminações intrafoliculares e intraperitoneais	67
3.5. EXPERIMENTO 5 – Avaliação da capacidade de fertilização do oócito, com a presença de 20×10^6 espermatozóides dentro do folículo pré-ovulatório	68
4. RESULTADOS	69
Experimento 1	69
Experimento 2	80
Parte I	80
Parte II	83
Parte III	89
Experimento 3	90
Experimento 4	92
Experimento 5	104
5. DISCUSSÃO	105
5.1. Avaliação da viabilidade do sêmen congelado de garanhões, quando diluído em fluido folicular de folículo pré-ovulatório de éguas.....	105
5.2. Avaliação da população espermática no oviduto de éguas após a inseminação artificial, utilizando diferentes técnicas de inseminação, com sêmen fresco e congelado de garanhões	108
5.3. Teste de fertilidade entre diferentes técnicas de inseminação artificial utilizando um baixo número de espermatozóides.....	112
6. CONCLUSÕES	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ABSTRACT	139
APÊNDICE	142

RESUMO

Em eqüinos existe um grande interesse em se desenvolver e aprimorar técnicas de inseminação artificial que possibilitam a obtenção de bons índices de fertilidade utilizando um baixo número de espermatozóides. O presente trabalho teve como objetivos avaliar: 1) a viabilidade, *in vitro*, do sêmen congelado de garanhões após a diluição em fluido folicular pré-ovulatório de éguas; 2) a população espermática no oviduto de éguas, utilizando diferentes técnicas de inseminação; 3) a fertilidade de éguas após a utilização de diferentes técnicas de inseminação artificial, utilizando um baixo número de espermatozóides; 4) a reação inflamatória na cavidade peritoneal após as inseminações intrafoliculares e intraperitoneais; 5) averiguar o efeito da presença de espermatozóides dentro do folículo pré-ovulatório, na capacidade de fertilização do oócito.

No experimento 1 foram realizadas análises laboratoriais da viabilidade espermática, de sêmen congelado de garanhões sem diluição (GI), diluído em Kenney (GII) e diluído em fluido folicular (GIII). Observou-se que porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra não diferiu significativamente entre os grupos ($p > 0,05$). Também não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos na porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra. A motilidade total foi significativamente inferior ($p < 0,05$) no grupo em que o sêmen foi diluído em fluido folicular (GIII) apenas no primeiro momento, logo após a diluição (T0). A motilidade progressiva foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo diluído com Kenney (GII) do que nos demais grupos em T0 e três horas após (T3). A velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em GIII do que em GI nos momentos T0, após uma (T1) e duas horas (T2) da diluição. A velocidade espermática considerando uma trajetória retilínea (VSL), a velocidade espermática ao longo de uma trajetória real (VCL) e a frequência dos batimentos flagelares (BCF) foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) em GI nos momentos T0, T1 e T2 quando comparado com GIII. No momento T3 não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos em nenhum dos parâmetros de motilidade avaliados.

No experimento 2 avaliou-se a população de espermatozóides nos ovidutos de éguas, após a inseminação artificial, com sêmen fresco e congelado de garanhões, utilizando as técnicas de inseminação no corpo do útero (IACU), na extremidade do corno uterino (IAPC), histeroscópica (IAH) e intraperitoneal (IAIP). As éguas foram inseminadas e abatidas 12 horas após a inseminação, para lavagem dos ovidutos. Após as inseminações com sêmen

congelado do garanhão A, a porcentagem de ovidutos em que foram encontrados espermatozoides (média de espermatozoides encontrados por oviduto) nos grupos GIA (IACU; 20×10^6), GIB (IAPC; 20×10^6), GIC (IAH; 20×10^6) e GID (IACU; 500×10^6) foram respectivamente de zero% (zero), 40% (4500), 25% (2500) e 25% (1250), não sendo observado diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Após as inseminações com sêmen fresco do garanhão B, a porcentagem de ovidutos em que foram encontrados espermatozoides (média de espermatozoides encontrados por oviduto) nos grupos GIIA (IACU; 20×10^6), GIIB (IAPC; 20×10^6), GIIC (IAH; 20×10^6), GIID (IACU; 500×10^6) e GIIE (IAIP; 100×10^6) foram respectivamente de zero% (zero), 40% (1000), 50% (1875), 80% (7750) e zero (0%), sendo que a porcentagem de ovidutos com espermatozoides de GIIA foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) a GIIB e GIIE, porém foi inferior ($p < 0,05$) a GIIC e GIID. A média de espermatozoides encontrados por oviduto foi significativamente maior ($p < 0,05$) em GIID do que nos demais grupos. Após as inseminações com sêmen congelado do garanhão B não foram encontrados espermatozoides em nenhum oviduto de nenhum dos grupos. A taxa de recuperação de espermatozoides, *in vitro*, 3 horas após a deposição de 20×10^6 espermatozoides dentro de folículos pré-ovulatório de éguas representou apenas 24,13% do número total de espermatozoides depositados nos folículos.

No experimento 3 foram realizados teste de fertilidade de diferentes técnicas de inseminação, utilizando um baixo número de espermatozoides. Não foi observado prenhez nos grupos em que as éguas foram inseminadas por inseminação intrafolicular (GIV; IAIF; sêmen congelado; 20×10^6) e por inseminação intraperitoneal (GV, IAIP; sêmen fresco; 100×10^6). A porcentagem de prenhez de GI (15%; IACU; sêmen congelado; 20×10^6) foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) a GII (40%; IAPC; sêmen congelado; 20×10^6) e GIII (45%; IAH; sêmen congelado; 20×10^6), não se diferenciando ($p > 0,05$) também de GIV e GV. As porcentagens de prenhez de GII e GIII foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) entre si e significativamente superiores ($p < 0,05$) a GIV e GV.

No experimento 4 avaliamos a reação inflamatória na cavidade peritoneal, após as inseminações intrafoliculares e intraperitoneais, através de análises laboratoriais do líquido peritoneal, coletado por paracentese. De todos os parâmetros avaliados somente a porcentagem de linfócitos e eosinófilos, a concentração de glicose e a presença de sangue não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre o momento T0 (antes da inseminação; GIP0) e 6 horas após as inseminações intraperitoneais (GIP6). Após a avaliação da reação inflamatória causada pela inseminação intrafolicular, observou-se que de todos os parâmetros avaliados somente a porcentagem de linfócitos e eosinófilos não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$)

entre o momento T0 (GIF0) e 6 horas após as inseminações intrafoliculares (GIF6). Não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados entre GIP6 e GIF6. Após a avaliação da reação inflamatória causada pela realização da primeira paracentese, sem inseminação (GC0 x GC6), bem como a reação inflamatória causada pela realização da primeira paracentese seguida de ovulação, sem inseminação (GCO0 x GCO6), não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados.

No experimento 5 avaliou-se o efeito da presença de espermatozoides dentro do folículo, sobre a fertilidade de éguas inseminadas com dose convencional de sêmen fresco (500×10^6). A porcentagem de prenhez de GA (50%), grupo em que as éguas foram inseminadas concomitantemente com 20×10^6 espermatozoides por IAIF (sêmen congelado de garanhão) e com 500×10^6 espermatozoides por IACU (sêmen fresco de jumento), foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) à porcentagem de prenhez de GB (83,33%), em que as éguas foram inseminadas com 500×10^6 espermatozoides por IACU (sêmen fresco de jumento).

Os resultados do presente trabalho mostraram que até três horas após a diluição, o fluido folicular não exerce efeitos deletérios à viabilidade espermática, as técnicas de inseminação IAPC e IAH são mais eficiente do que a IACU, quando se utiliza uma baixa dose inseminante, que as IAIP e IAIF não foram eficientes na obtenção de fertilização e que o insucesso da IAIF não se deve apenas à distúrbios na viabilidade do oócito e sim a uma interação de vários fatores.

Palavras-chave: Baixa dose inseminante; Equino; Sêmen congelado; Técnicas de inseminação; Transporte espermático; Viabilidade espermática

1. INTRODUÇÃO

Várias biotécnicas como a inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* têm sido aplicadas em programas de reprodução assistida de várias espécies, visando a obtenção de melhores índices de fertilidade de indivíduos portadores de subfertilidade de origem não hereditária e também maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial genético.

Em eqüinos existe um grande interesse em se desenvolver e aprimorar técnicas de inseminação artificial que possibilitem a obtenção de bons índices de fertilidade utilizando um baixo número de espermatozoides. A necessidade de um elevado número de espermatozoides para a realização da inseminação artificial convencional, onde o sêmen é depositado no corpo do útero das éguas, limita a aplicação do sêmen congelado e sexado (Leão, 2002).

Usualmente as éguas são inseminadas com 300 a 500 milhões de espermatozoides móveis, sendo que quando se utiliza sêmen congelado ou refrigerado o número total de células se aproxima de um bilhão (Squires et al., 1999). Entretanto, poucos destes gametas (1000 a 10.000) terão acesso ao oviduto, e este fato é resultado de uma severa seleção espermática que ocorre durante o transporte uterino (Parker et al., 1975) e também pela passagem através da junção útero-tubárica (Vazquez et al., 1998). Já foi demonstrado que é possível a obtenção de fertilização utilizando um número reduzido de espermatozoides, como mostram os resultados de Carnevale et al. (1999) que obtiveram 50% de prenhez com a deposição de 500.000 espermatozoides direto no oviduto de éguas.

O desenvolvimento de técnicas de inseminação artificial que permitem a aplicação de uma baixa dose inseminante em éguas, favoreceu o uso do sêmen congelado, melhorando sua eficiência e viabilizou a aplicação do sêmen sexado, além de que com a utilização destes novos protocolos de inseminação, observou-se uma melhora na fertilidade de alguns garanhões subférteis (Morris & Allen, 2002).

A crescente utilização do sêmen congelado nos criatórios de eqüinos é notório, fato este que tem impulsionado as pesquisas voltadas a solucionar os problemas relativos ao uso desta biotécnica. Sabidamente um dos fatores limitantes à utilização rotineira de sêmen congelado em eqüinos está relacionado à própria espécie, onde uma grande porcentagem dos garanhões apresentam características de sêmen pós-descongelamento (motilidade, integridade de membrada) inadequadas para uso (Squires et al., 1999).

Outra observação relevante é o fato de que, mesmo apresentando sêmen com motilidade pós-descongelamento dentro dos padrões adequados, muitas vezes os resultados de

fertilidade são aquém do esperado. Por outro lado, em algumas situações, cavalos com motilidade intermediária apresentam bons índices de prenhez. Certamente, doses de sêmen com características seminais abaixo do razoável, ou seja, motilidade progressiva inferior a 30%, número de espermatozoides inferior a 500 milhões associadas a um alto percentual de células lesadas, apresentam índices de fertilidade frustrantes. Tem sido observada uma variação de 10 a 70% nos índices de fertilidade por ciclo, para sêmen congelado de diferentes garanhões. Havendo uma tendência a uma boa repetibilidade de resultados de fertilidade, ou seja, sêmen de garanhões que proporcionam uma alta fertilidade, geralmente apresentarão bons resultados independentes da partida utilizada (Squires et al., 1999).

Algumas técnicas, como as inseminações histeroscópica, intrafolicular, intraperitoneal e inseminação em que a deposição do sêmen é realizada na extremidade do corno uterino ipsilateral ao folículo dominante, poderão ser utilizadas no processo de reprodução assistida, para o manejo de garanhões com problemas de fertilidade, que possuam baixa motilidade do sêmen, bem como uma alternativa para maximização do uso do sêmen congelado e sexado. Estas técnicas também podem viabilizar a obtenção de potros de éguas que possuam problemas de transporte espermático no útero, e também de éguas que desenvolvam uma endometrite severa após a inseminação artificial, sendo que estes fatores ocorrem com maior frequência em éguas velhas (Scott et al., 1995; Watson, 1998).

O transporte espermático até o oviduto pode estar completo em quatro horas após a inseminação, em éguas normais, pois as taxas de concepção são significativamente mais baixas quando se faz lavagem uterina meia hora ou duas horas após a inseminação, do que quando a lavagem uterina é realizada quatro horas após a inseminação (Brinsko et al., 1991).

O transporte e sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino, varia entre garanhões férteis e subférteis, entre éguas férteis e com problemas reprodutivos e também entre sêmen fresco e congelado. O número total de espermatozoides que alcançam o oviduto quatro horas após a inseminação com sêmen de um garanhão fértil é significativamente maior do que quando se utiliza sêmen de um animal subfértil (Scott et al., 1995).

Em éguas que não possuíam problemas reprodutivos foram observados mais espermatozoides com alta motilidade na porção caudal do ístimo do que em éguas subférteis após a inseminação (Scott et al., 1995).

O local de deposição do sêmen no momento da inseminação é um fator bastante estudado em todas as espécies, pois é de suma importância para obtenção de bons resultados de fertilidade. Em monta natural, o ejaculado é depositado no corpo do útero das éguas

(Ginther, 1992), o mesmo local em que se faz a deposição do sêmen na inseminação artificial convencional. Este local de deposição é adequado quando se trabalha com alto número de espermatozoides capazes de fertilizar oócitos, mas quando este número é limitado, uma alternativa de aproximação dos gametas ao sítio de fertilização pode ser desejável.

Com base na hipótese de que a deposição do sêmen mais próximo do sítio de fertilização, no momento da inseminação artificial, leva a um aumento da população espermática no oviduto das éguas, melhorando as taxas de fertilidade, foram delineados cinco experimentos para avaliar a eficiência das técnicas de inseminação no corpo do útero, na extremidade do corno uterino e histeroscópica, bem como, avaliar a eficiência, aplicabilidade e segurança das técnicas de inseminação intraperitoneal e intrafolicular.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar: 1) a viabilidade, *in vitro*, do sêmen congelado de garanhões após a diluição em fluido folicular pré-ovulatório de éguas; 2) a população espermática no oviduto de éguas, utilizando diferentes técnicas de inseminação; 3) a fertilidade de éguas após a utilização de diferentes técnicas de inseminação artificial, utilizando um número reduzido de espermatozoides; 4) a reação inflamatória na cavidade peritoneal após as inseminações intrafoliculares e intraperitoneais; 5) averiguar o efeito da presença de espermatozoides dentro do folículo pré-ovulatório, na capacidade de fertilização do oócito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeitos do fluido folicular sobre a viabilidade espermática.

Os espermatozóides de mamíferos não são capazes de fertilizar o oócito imediatamente após a ejaculação. *In vivo*, os espermatozóides são depositados no trato reprodutivo da fêmea, onde sofrem alterações estruturais e metabólicas, tornando-se aptos à fertilização. Estas modificações na composição e fluidez da membrana plasmática dos espermatozóides, alterações na concentração intracelular de íons e alterações no metabolismo oxidativo estão associadas ao processo de capacitação. Como resultado deste processo, os espermatozóides podem sofrer reação acrossomal em resposta a estímulos fisiológicos como o contato com a zona pelúcida ou componentes do fluido folicular (Marin-Briggiler et al., 1999).

Antes de ocorrer a ovulação os espermatozóides interagem com as células epiteliais do oviduto, reduzindo seu metabolismo e mantendo assim sua viabilidade por mais tempo (Pollard et al., 1991). Após a ovulação parte do fluido folicular, juntamente com o oócito penetram no oviduto e os espermatozóides lá presentes entram em contato com o fluido folicular, que afeta algumas funções espermáticas (Yao et al., 1999).

De acordo com Fakhri et al. (1990) o fluido folicular é estável e alguns de seus componentes parecem melhorar a função espermática. Tem sido demonstrado que o fluido folicular pré-ovulatório aumenta o influxo de cálcio na membrana espermática, aumentando assim a habilidade do espermatozóide de penetrar oócito (Yee & Cummings, 1988).

O fluido folicular humano (hFF) é um modulador dos parâmetros de movimento dos espermatozóides e é um indutor de reação acrossomal que é um passo importante da fertilização em mamíferos (Hong et al., 1993).

Uma alta correlação tem sido reportada entre a concentração de progesterona e a capacidade do hFF de induzir a reação acrossomal. A remoção de progesterona do hFF reduz sua capacidade de induzir reação acrossomal, que pode ser restaurada, em parte, através da adição de progesterona, sugerindo que outros fatores também podem estar envolvidos (Morales et al., 1992).

A progesterona está presente em altas concentrações no fluido folicular, bem como nas células do cumulus oócito e este pode ser o começo de um possível estímulo fisiológico para os espermatozóides durante o trânsito no trato genital feminino e no momento da fertilização (Lukoseviciute et al., 2004).

Em programas de reprodução assistida de humanos, o tratamento dos espermatozoides com hFF melhora significativamente as taxas de gestação, sugerindo que ele exerça algum papel no processo de fertilização (Giorgetti et al., 1992).

Fakih et al. (1990) observaram um aumento na taxa de prenhez da GIFT (transferência intra-falopiana de gametas) quando o fluido folicular foi utilizado para capacitação espermática e como meio para transferência de gametas.

Em estudo realizado com sêmen humano Yao et al. (1999) avaliaram *in vitro* os efeitos do hFF e das células do oviduto sobre a motilidade espermática, reação acrossomal, capacidade de ligação dos espermatozoides com a zona pelúcida e capacidade de fusão dos espermatozoides com o oócito e observaram que no grupo em que os espermatozoides foram tratados com hFF e células do oviduto ao mesmo tempo, todos os parâmetros de motilidade, avaliados pelo método CASA, foram significativamente superiores aos do grupo controle, em que estes elementos não estavam presentes. Esta diferença também foi encontrada quando o grupo controle foi comparado com os grupos tratados apenas com fluido folicular ou células do oviduto, com exceção para a porcentagem de espermatozoides com movimento linear (LIN), que não diferiram significativamente entre os grupos. Observou-se que a incidência de reação acrossomal foi superior nos grupos tratados apenas com fluido folicular e tratados com células do oviduto juntamente com fluido folicular, após uma hora de tratamento. Entretanto, a incidência de reação acrossomal foi superior no grupo tratado apenas com fluido folicular do que no grupo em que continha hFF e células do oviduto. O número de espermatozoides ligados à zona pelúcida foi significativamente superior no grupo controle quando comparado com os demais grupos. A taxa de penetração em oócito no grupo contendo apenas hFF foi superior ao grupo tratado com hFF e células do oviduto, não sendo observado penetração no grupo controle.

Em 1996 Yao et al. demonstraram que o hFF inibe a ligação dos espermatozoides com a zona pelúcida, mas o papel fisiológico do efeito inibitório do hFF sobre a ligação dos espermatozoides com a zona pelúcida ainda não está esclarecido. Em suínos o fluido folicular inibe a ligação dos espermatozoides com a zona pelúcida e reduz a polispermia (Funahashi & Day, 1993).

Em estudo realizado por Hong et al. (2003), em que avaliaram o efeito das células do cumulus, sobre o efeito inibitório do hFF na ligação dos espermatozoides com a zona pelúcida, constatou-se que as células do cumulus reduzem a atividade inibitória do hFF sobre esta função, o que pode explicar o motivo pelo qual a presença de hFF não afeta negativamente a fertilização. Tendo estes autores sugerido que este efeito inibitório do hFF

pode ser uma forma de seleção dos espermatozóides que tenham uma grande capacidade de passar pelas células do cumulus e se ligar à zona pelúcida.

Yao et al. (2000) demonstraram que o hFF promove a capacitação de espermatozóides humanos em um curto espaço de tempo e este efeito é dose dependente, além de observarem que após uma hora de tratamento o hFF induz a reação acrossomal. Neste mesmo trabalho observou-se, *in vitro*, que no grupo tratado com hFF, as velocidades espermáticas ao longo de uma trajetória real (VCL), de uma trajetória retilínea (VSL) e uma trajetória média (VAP) não sofreram uma redução significativa durante 5 horas de tratamento, entretanto estes valores reduziram significativamente no grupo controle após 3 horas de tratamento. Não foi observado diferença significativa no deslocamento lateral da cabeça (ALH) entre os grupos.

Burrello et al. (2004) observaram que o hFF estimula a reação acrossomal de espermatozóides capacitados de forma dose dependente e o maior efeito estimulatório foi com uma concentração de 30% de hFF, a qual aumentou aproximadamente quatro vezes o número de espermatozóides com acrossoma reagido.

Com objetivo de caracterizar o movimento dos espermatozóides de suínos, quando diluídos em fluido folicular e em fluidos de diferentes partes do oviduto, Nichol et al. (1997) observaram que o VCL foi significativamente superior no grupo tratado com fluido folicular, quando comparado com o fluido de diferentes partes do oviduto, fato este que também foi encontrado com os valores de ALH, sendo que os espermatozóides mostraram um movimento mais vigoroso quando diluídos em fluido folicular, concluindo que o fluido que mais influenciou no tipo de movimento foi o fluido folicular.

Munuce et al. (2004) observaram que a presença de 50% de hFF no meio reduz significativamente o número de espermatozóides ligados à zona pelúcida. Não sendo encontrado diferença estatística na porcentagem de espermatozóides viáveis ou com motilidade progressiva, entre o grupo tratado com hFF e o grupo controle (HTF). Também não foi encontrado diferença significativa, na porcentagem de espermatozóides com reação acrossomal entre o grupo controle (7,5%) e o grupo tratado (6,5%). Tendo os autores concluído que a redução na capacidade de se ligar a zona pelúcida não está associada com a queda na viabilidade espermática, motilidade e reação acrossomal e sim com uma redução no número de receptores de α -D-manose na membrana dos espermatozóides, que é uma proteína que participa do reconhecimento e ligação dos gametas.

Thérien et al. (2001) observaram que o fluido folicular bovino estimulou a capacitação de espermatozóides oriundos do epidídimo de bovinos e este estímulo foi

acentuado quando os espermatozóides foram incubados previamente com proteínas do plasma seminal. McNutt & Killian (1991) também demonstraram que o fluido folicular foi capaz de induzir a capacitação espermática em apenas 2 horas de incubação quando os espermatozóides foram diluídos em meio com mais de 60% de fluido folicular e em 4 horas quando diluídos em meio com 20% de fluido folicular.

Em estudo realizado por Thérien et al. (2001) foi demonstrado que a viabilidade e motilidade dos espermatozóides de bovino incubados com fluido folicular reduziu mais rapidamente do que no grupo controle. Fato este, também observado por McNutt & Killian (1991) quando utilizaram mais de 20% de fluido folicular na diluição do sêmen, tendo estes autores sugerido que esta redução na motilidade poderia ser uma consequência da aglutinação espermática que ocorre com a diluição do sêmen em fluido folicular.

Lukoseviciute et al. (2004) observaram que a progesterona facilitou a capacitação, mas não teve efeito na indução da reação acrossomal em espermatozóides congelados de bovinos, não capacitados e capacitados por indução de heparina. Observaram também, que uma exposição prolongada de espermatozóides em uma concentração de progesterona, maior do que a concentração de progesterona do fluido folicular, teve leves efeitos positivos sobre a viabilidade espermática. Entretanto, Thérien & Manjunath (2003) concluíram que a concentração de progesterona maior que $2\mu\text{g/mL}$, provoca um decréscimo significativo na viabilidade dos espermatozóides em seis horas de incubação.

Em um estudo realizado com sêmen de garanhões, onde avaliou-se a porcentagem de espermatozóides móveis e porcentagem de espermatozóides capazes de penetrarem na *zona-free* de oócitos de Hamster, Landim-Alvarenga et al. (2001) observaram que a porcentagem de espermatozóides móveis, após 2 horas de incubação foi maior quando os mesmos foram incubados com a presença de fluido folicular no meio. Entretanto a presença de fluido folicular no meio com ou sem agentes capacitantes não teve efeito na habilidade dos espermatozóides de penetrarem na *zona-free* de oócitos de Hamster.

A progesterona é considerada um indutor fisiológico de reação acrossomal em espermatozóides de garanhões (Rathi et al., 2002) e o fluido folicular pré-ovulatório contém altas concentrações de progesterona (Bogh et al., 2000), podendo assim ocorrer uma indução da reação acrossomal após a diluição dos espermatozóides em fluido folicular. Entretanto, Arns et al. (1991) demonstraram que apenas 13% dos espermatozóides incubados por 3 horas em fluido folicular sofreram reação acrossomal espontânea, enquanto 25% dos espermatozóides incubados e tratados com zona pelúcida solubilizada sofreram reação acrossomal.

2.2. Transporte espermático

Normalmente, os ejaculados de garanhões férteis possuem de 2 a 15×10^9 espermatozóides, os quais, durante a monta natural são depositados diretamente no útero. Devido a contrações do miométrio e motilidade dos espermatozóides, o útero é banhado com o sêmen (Morris & Allen, 2002). Entretanto, após 8 a 20 minutos de contrações uterina, a maioria do ejaculado é eliminada do útero (Katila et al., 2000) e os espermatozóides que permanecem no útero são encontrados na junção útero tubárica, associados com as células epiteliais do oviduto (Morris & Allen, 2002).

Tanto com a inseminação artificial convencional ou monta natural, os espermatozóides que são depositados no corpo do útero das éguas tem que migrarem por todo útero até o oviduto e devido a este fato é importante que o sêmen apresente boa motilidade, principalmente para os espermatozóides passarem pelo processo edematoso da junção útero-tubárica, que em eqüinos é a maior barreira para que os espermatozóides alcancem o sítio de fertilização (Hunter, 1999).

Em muitas espécies observa-se um rápido transporte espermático por todo trato reprodutivo feminino, inclusive na tuba uterina, sendo possível detectar a presença de espermatozóides na cavidade abdominal, o que ainda não foi demonstrado em eqüinos (Overstreet et al., 1978).

Em ovelhas e vacas cobertas durante o estro, são necessárias de seis a oito horas para que uma quantidade suficiente de espermatozóides alcancem a tuba uterina e de dez a doze horas para penetrarem na tuba uterina, sendo que nas ovelhas a passagem dos espermatozóides para o interior da tuba é mais rápida quando a monta é realizada próximo ao momento da ovulação (Hunter & Wilmut, 1982).

Em eqüinos o transporte espermático é completo quatro horas após a inseminação (Brinsko et al., 1991). O sêmen espalha-se pelo útero em consequência de um aumento nas contrações uterinas após a inseminação, devido a presença de prostaglandina no sêmen (Hunter, 1999).

Pode-se encontrar espermatozóides no oviduto de éguas poucos minutos após a deposição do sêmen no corpo do útero. Bader (1982) recuperou uma média de 1000 espermatozóides na ampola de ovidutos, 4 horas após a inseminação artificial e Parker et al. (1975) recuperaram uma média de 6000 espermatozóides de cada oviduto, 12 horas após a inseminação artificial.

Os espermatozóides penetram na tuba uterina de porcas entre 15 e 30 minutos após a inseminação ou monta natural (First et al., 1968) e após uma hora, uma quantidade de espermatozóides suficiente para fertilizar 90% dos oócitos já penetraram no oviduto (Hunter, 1984).

O transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino é melhor quando se utiliza sêmen de garanhões férteis do que subférteis, quando se trabalha com éguas sem problemas reprodutivos, e também quando se utiliza sêmen fresco no momento da inseminação (Scott et al., 1995).

Foi demonstrado que a habilidade dos espermatozóides provenientes de sêmen congelado, de atingirem o oviduto, particularmente a região da ampola, é menor do que de sêmen fresco (Bader, 1982). É bastante discutível a redução no transporte espermático de sêmen congelado, que pode incluir alterações bioquímicas na membrana dos espermatozóides, além da retirada do plasma seminal antes do processo de criopreservação. O plasma seminal tem sido proposto por ter influência no transporte espermático de várias espécies, incluindo eqüinos (Clavert et al., 1985). O plasma seminal contém vários hormônios, enzimas e metabólitos, mas pouco se conhece sobre a função destes componentes. Não existem evidências diretas do papel do plasma seminal sobre o transporte espermático, embora acredite-se que o plasma é de grande importância para sobrevivência e transporte dos espermatozóides no útero de éguas (Troedsson et al., 1998).

Tem sido sugerido que a liberação de ocitocina após a cópula possa facilitar o transporte espermático no útero, mas ainda não foi estabelecido uma relação funcional entre estes fatores. O plasma seminal eqüino contém pouca prostaglandina, mas recentemente foi reportado a liberação de ocitocina pela pituitária de éguas em cio, por estímulo do garanhão (Alexander et al., 1995) e estes fatores podem ter uma participação no aumento da atividade miometrial, que ocorre meia hora após a inseminação artificial ou monta natural, sendo de grande importância para o transporte espermático.

Também é observado uma segunda fase de atividade miometrial, que acontece quatro horas após a inseminação e se mantém até 12 horas após. Esta segunda fase de contração parece ser mais importante para remoção dos espermatozóides do útero do que para transporte espermático (Troedsson et al., 1998).

Utilizando a técnica de cintilografia, Katila et al. (2000) detectaram a presença de espermatozóides marcados radioativamente na extremidade do corno uterino, de oito a vinte minutos após a inseminação artificial. Observaram também uma variedade nas contrações

uterinas entre as éguas, oscilando de cinco a 65 contrações em 30 minutos após a inseminação.

Em espécies que possuem apenas uma ovulação não está bem definido se existe um transporte preferencial dos espermatozóides para a tuba uterina adjacente ao ovário que ocorreu ou vai ocorrer a ovulação. Existem evidências circunstanciais as quais favorecem este fato, como uma maior vascularização do corno uterino ipsilateral ao ovário que contém o folículo dominante. A atração quimiotática dos espermatozóides ao corno ipsilateral a ovulação ainda é polêmico e não se tem uma explicação exata (Hunter, 1999). De acordo com alguns estudos a quimiotaxia do espermatozóide parece ser mediada por fatores presentes no fluido folicular produzidos pelo oócito maduro (Villanueva et al., 1990).

Em um estudo feito por Navarro et al. (1998), o qual avaliou a migração dos espermatozóides de eqüinos em direção ao fluido folicular ou uma solução controle, constatou-se que em 92,7% das amostras houve migração espermática, sendo que a migração para os reservatórios de fluido folicular (66,05%) foi significativamente maior do que para os reservatórios de solução controle (14,35%), mostrando que o fluido folicular de éguas tem efeito quimiotático sobre os espermatozóides de garanhões.

Na maioria dos mamíferos domésticos, a monta natural precede a ovulação em um intervalo fixo de tempo, de acordo com cada espécie. Portanto, a forma e o tempo de migração dos espermatozóides através do trato reprodutivo feminino parece ocorrer em consequência de variações endocrinológicas das fêmeas durante as diferentes fases do ciclo. Em ratos, um número de espermatozóides significativamente maior foi encontrado na região do ístmo, três horas após a inseminação artificial realizada durante o estro, do que nas demais fases do ciclo (Orihuela et al., 1999).

A interação dos espermatozóides de eqüino com as células epiteliais do oviduto, *in vitro*, independem das condições hormonais do co-cultivo destas células. Entretanto, um maior número de espermatozóides se aderem às células do ístmo, as quais são co-cultivadas em condições hormonais semelhantes às fases folicular e pós-ovulação, do que em células co-cultivadas em condição semelhante ao diestro. Sendo a motilidade dos espermatozóides aderidos significativamente maior, no co-cultivo de células em condições semelhante à fase folicular do que nas demais fases do ciclo (Thomas et al., 1994a).

Rigby et al (2000) demonstraram que a deposição do sêmen na extremidade do corno uterino, ipsilateral ao folículo dominante, resultou em uma maior proporção de espermatozóides recuperados do oviduto do mesmo lado, do que quando os espermatozóides foram depositados no corpo do útero. Acredita-se que o aumento do número de

espermatozoides no oviduto pode melhorar as taxas de fertilidade e a deposição do sêmen mais próximo da junção útero-tubárica pode levar a esta melhora na fertilidade (Brinsko et al., 1991).

Ao atingirem o oviduto, os espermatozoides interagem com as células epiteliais formando um reservatório de gametas funcionais na porção caudal do istmo, onde os espermatozoides os quais se aderem ao oviduto mantêm a motilidade e capacidade fertilizante por um tempo mais prolongado (Pollard et al., 1991), fato importante na espécie equina que possui o estro prolongado. Entretanto poucos destes espermatozoides aderidos às células epiteliais do oviduto, atingem o local de fertilização no momento da ovulação (Hunter, 1996), evitando a penetração de vários espermatozoides no oócito.

Ao penetrar na tuba uterina os espermatozoides sofrem uma diminuição drástica na motilidade que se mantém até o momento da ovulação e isto pode ser devido à presença de um muco bastante viscoso na tuba uterina (Hunter, 1999) e a baixa temperatura do istmo antes da ovulação (Hunter et al., 1984).

Os espermatozoides estocados na região do istmo fazem um contato direto da cabeça com os cílios das células epiteliais do oviduto. Os gametas viáveis fazem uma adesão celular específica com as organelas pela porção rostral da cabeça (Pollard et al., 1991; Suarez et al., 1991). Uma pequena porção dos carboidratos do epitélio e lectinas da cabeça dos espermatozoides estão envolvidas neste processo (Suarez et al., 1998) e resíduos de fucose também parecem ter uma importância funcional na ligação do espermatozoide com o istmo em bovinos (Lefebvre et al., 1997).

Utilizando anticorpo contra componentes da membrana plasmática de espermatozoides de equinos, cultivo de células epiteliais do oviduto e espermatozoides de equinos, Thomas et al. (1997) observaram que uma ou mais proteínas ou componentes glicoprotéicos da porção rostral da membrana plasmática dos espermatozoides, *in vitro*, são mediadores da adesão entre os gametas e as células epiteliais do oviduto.

A interação dos espermatozoides com as células do oviduto resulta em um aumento intracelular de cálcio e aumenta as junções tipo *gaps* nas células epiteliais do oviduto (Ellington et al., 1993a). A concentração intracelular de cálcio dos espermatozoides aderidos é mantida em níveis basais, prevenindo que a capacitação ocorra muito cedo (Dobrisnki et al., 1996a). Os espermatozoides liberados desta interação mostram alterações associadas com a capacitação e apresentam uma hiperativação da motilidade (Ellington et al., 1993b) se ligando posteriormente à zona pelúcida de oócito equinos.

Ellington et al. (1993b) observaram que espermatozóides eqüinos que não se ligaram à camada de células do oviduto durante os primeiros 30 minutos de cultivo apresentavam uma alta proporção de membrana acrossomal danificada. Thomas et al. (1994b) concluíram que os espermatozóides de garanhões que não se ligaram às células epiteliais do oviduto, foram aqueles com alta proporção de anormalidades morfológicas e baixa motilidade.

De acordo com Pollard et al. (1991), a população de espermatozóides aderidos ao oviduto possuem alta motilidade. Hunter et al. (1991) avaliaram a morfologia dos espermatozóides presentes no ístmo, por microscopia eletrônica, e não foi encontrada nenhuma célula com anormalidade morfológica, indicando que ocorre uma seleção de espermatozóides no trato reprodutivo feminino.

Scott et al. (2000) desenvolveram um experimento onde avaliaram, através de microscopia eletrônica, os ovidutos de 12 éguas jovens com histórico reprodutivo normal, quatro horas após a inseminação artificial com 1×10^9 espermatozóides com motilidade progressiva, oriundo de sêmen fresco, contendo de 66 a 85% de espermatozóides morfológicamente anormais e encontraram espermatozóides em todas as partes do oviduto, variando a forma de interação dos gametas com o epitélio dependendo da região. Os espermatozóides foram encontrados com maior abundância nas dobras epiteliais da porção uterina da junção útero-tubárica e mais de 90% das células eram morfológicamente normais. Estas observações indicam que os espermatozóides de eqüino, morfológicamente normais, desenvolvem uma interação específica com o epitélio do trato reprodutivo durante o transporte para o oviduto. Através destes achados os autores também acreditam que a porção uterina da junção útero-tubárica pode ser um reservatório pré-ovulatório de espermatozóides e a escassez de espermatozóides anormais encontrados indica que a maioria dos espermatozóides anormais não alcançam a junção útero-tubárica ou não desenvolvem uma interação adequada com o epitélio do oviduto.

Através de microscopia eletrônica de varredura, de ovidutos de éguas coletados após a inseminação artificial, Scott et al. (2002) observaram que a interação morfológica dos espermatozóides com as células epiteliais do oviduto, não é diferente entre amostras coletadas quatro e 18-26 horas após a inseminação. Entretanto, a distribuição regional dos gametas mostrou-se diferente, sendo encontrados mais espermatozóides nas dobras do lúmen, do que na porção uterina da junção útero-tubárica, quando as amostras foram coletadas 18-26 horas após a inseminação.

O momento da ativação e liberação dos espermatozóides ocorre pouco tempo antes da ovulação, tendo como consequência a entrada do oócito no oviduto e esta importante transferência de informações entre o folículo pré ovulatório e o tecido do ístmo ocorre devido a um mecanismo de contra corrente vascular do pedículo ovariano (Stefanczyk et al., 1994). Vários grupos de hormônios estão envolvidos neste processo, incluindo esteróides, prostaglandinas e hormônios peptídeos, sendo que os esteróides parecem exercer um papel principal (Hunter, 1995).

De acordo com Katila (2001) a interação sêmen-útero pode ser modificada por vários fatores como a concentração do volume inseminante, o número de espermatozóides utilizados, motilidade e viabilidade dos espermatozóides, o volume de sêmen e a presença ou ausência de plasma seminal.

Jasko et al. (1992) demonstraram que a concentração espermática $\geq 25 \times 10^6$ /mL é mais importante do que o volume de sêmen utilizado no momento da inseminação. Neste estudo as éguas foram inseminadas utilizando concentrações de 5, 25 ou 50×10^6 espermatozóides por mL e observaram uma taxa de recuperação embrionária significativamente menor usando uma concentração de 5×10^6 espermatozóides/mL.

Parker et al. (1975) observaram que poucos espermatozóides foram recuperados de ovidutos 24 horas após a inseminação, quando a motilidade inicial do sêmen era de 30%, quando comparado com a utilização de um sêmen com motilidade inicial entre 60 e 70%, sugerindo que a motilidade pode até não ser importante para o transporte espermático pelo útero, mas é necessária para o transporte na junção útero-tubárica e oviduto.

A criopreservação de espermatozóides de garanhões diminui a capacidade dos mesmos de se aderirem com as células epiteliais do oviduto e o tempo de sobrevivência destes gametas. Dobrinsk et al. (1995) desenvolveram um experimento com objetivo de avaliar, *in vitro*, a interação do sêmen fresco e congelado de garanhões com as células epiteliais do oviduto e zona pelúcida, onde observaram que poucos espermatozóides oriundos de sêmen congelado aderiram as células epiteliais do oviduto, quando comparados com sêmen fresco. A média de espermatozóides ligados a zona pelúcida e a porcentagem de espermatozóides com acrossoma intacto, também foi menor com a utilização de sêmen congelado. Os autores acreditam que esta redução na habilidade de se aderirem as células epiteliais do oviduto e zona pelúcida, dos espermatozóides oriundos de sêmen congelado, pode explicar em parte, a taxa de fertilidade inferior obtida com a utilização de sêmen congelado, quando comparado com sêmen fresco em equinos.

Ellington et al. (1999) compararam a taxa de concepção ao primeiro serviço, utilizando sêmen congelado de garanhões, com a viabilidade e tempo de sobrevivência espermática deste sêmen, *in vitro*, em co-cultura de células epiteliais do oviduto e observaram que garanhões com taxa de fertilidade maior que 65% ao primeiro serviço, apresentaram um maior número de espermatozóides e maior tempo de viabilidade dos gametas aderidos às células epiteliais do oviduto, quando comparados com garanhões que apresentaram uma taxa de fertilidade menor que 44% ao primeiro serviço.

Após a monta natural ou inseminação artificial em éguas, ocorre uma resposta inflamatória transitória fisiológica, caracterizada por um rápido influxo de neutrófilos para o lumen uterino, causado tanto por sêmen fresco quanto por congelado (Kotilainen et al., 1994; Parlevliet et al., 1997).

Troedsson et al. (1998) baseado em observações clínicas, notaram que a inseminação com sêmen congelado resulta em uma acentuada resposta inflamatória. Um fator que pode estar envolvido com esta resposta aguda é a retirada do plasma seminal durante o processo de criopreservação, já que o plasma seminal suprime a migração de neutrófilos *in vivo* (Troedsson et al., 2001).

Kotilainen et al. (1994) sugeriram que, a causa desta forte resposta inflamatória, seria devido à deposição de um número elevado de espermatozóides mortos presentes no sêmen congelado, quando comparados com sêmen fresco.

Esta endometrite nas éguas trata-se de um mecanismo fisiológico normal de limpeza do útero, e serve para eliminar o excesso de sêmen após a monta ou inseminação, criando assim condições favoráveis do útero para receber o embrião (Pycocock, 1999).

A resposta inflamatória pode afetar negativamente a fertilidade se a égua for susceptível à persistência desta endometrite e permanecer com acúmulo de fluido uterino após 4 a 5 dias da ovulação, período em que o embrião migra para o útero, levando a morte embrionária (Watson, 2000). Zent et al. (1998) demonstraram que 10 a 15% de uma população normal de éguas, eram susceptíveis à permanência de endometrite.

Acredita-se que na região da junção útero-tubárica a reação inflamatória ocorre de forma menos intensa (Scott, 2000), pois se a reação fosse igual em todo útero, os espermatozóides que se aderem nas criptas da papila poderiam induzir uma infiltração de neutrófilos neste local, interferindo no número de gametas aderidos ao reservatório de espermatozóides funcionais.

Lindsey et al. (2001) sugeriram que o uso de um baixo número de espermatozóides e um baixo volume diretamente sobre a junção útero-tubárica, pode reduzir a endometrite pós

inseminação, o que é particularmente importante quando as inseminações são realizadas em éguas com problemas reprodutivos. Entretanto, Sieme et al. (2004), utilizando sêmen fresco, observaram que nas éguas com problemas reprodutivos, a taxa de prenhez foi significativamente menor quando foram realizadas inseminações histeroscópicas, quando comparada com as inseminações no corpo do útero, mas em éguas normais os resultados foram melhores quando as éguas foram inseminadas por histeroscopia.

Através de citologia uterina, Gomes (2002) verificou que a dose convencional de sêmen congelado de garanhões (800×10^6 espermatozóides) causa uma exacerbada resposta inflamatória uterina e observou também que a inseminação histeroscópica com baixa dose de sêmen congelado (40×10^6), levou a uma menor resposta inflamatória quando comparada com a inseminação com dose convencional. Entretanto, quando comparada com a inseminação com baixa dose no corpo do útero, a inseminação histeroscópica causou uma maior reação inflamatória no útero, mas não causou uma depreciação dos índices de fertilidade.

De acordo com Squires (2001) o desenvolvimento de técnicas que permitem o uso de um baixo número de espermatozóides bem como a deposição do sêmen na região da papila, onde a reação inflamatória é menos intensa do que nas demais porções do útero, podem reduzir a incidência de endometrite após a inseminação, melhorando assim os índices de fertilidade.

2.3. Técnicas de inseminação artificial

Visando melhorar os índices de fertilidade de indivíduos subférteis e maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial pela utilização de um baixo número de espermatozóides no momento da inseminação, vários estudos tem sido desenvolvidos em diferentes espécies.

Em eqüinos o método convencional de inseminação se faz pela deposição de aproximadamente 400×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero (Squires et al., 1999), os quais terão que atingir o oviduto, local onde ocorre a fertilização.

De acordo com Morris & Allen (2002a) a taxa de concepção por ciclo é de 60% quando as éguas são cobertas naturalmente e uma média de 1.88 coberturas são necessárias para a obtenção de uma gestação. Entretanto, uma taxa de concepção maior que 60% foi obtida por Householder et al. (1981), através da inseminação artificial realizada com no mínimo 300×10^6 espermatozóides móveis oriundos de sêmen fresco de garanhões.

A dose inseminante recomendada quando se utiliza sêmen congelado de garanhões é de 300 a 500×10^6 espermatozóides móveis e mesmo utilizando um alto número de espermatozóides a taxa de concepção com sêmen congelado é de 30 a 70% (Squires et al., 1999). Samper & Morris (1998) obtiveram uma taxa de concepção de 73% utilizando 600×10^6 espermatozóides oriundos de sêmen congelado, sendo as inseminações realizadas 24 e 36 horas após a administração de um implante subcutâneo de um análogo de GnRH.

Técnicas que permitem o uso de um número reduzido de espermatozóides, visando um melhor aproveitamento do sêmen de indivíduos subférteis ou inférteis que apresentam oligozoospermia, vem sendo aplicadas em Medicina Humana, com resultados satisfatórios (Jansen et al., 1988; Izuka, 1991). Sendo uma destas técnicas a inseminação histeroscópica, em que o sêmen depositado próximo ao oviduto, sobre a junção útero-tubárica (papila), através de um aparelho de endoscopia via lumen uterino. Dentro desta linha, alguns autores têm estudado a aplicação da inseminação histeroscópica em eqüinos. Morris et al. (2000a) obtiveram um índice de prenhez de 60%, inseminando 15 éguas com 10×10^6 espermatozóides provenientes de sêmen fresco, os quais foram depositados sobre a papila tubárica com auxílio de um endoscópio. Vazquez et al. (1998), empregando técnica similar, utilizando aproximadamente $3,8 \times 10^6$ espermatozóides com motilidade progressiva, obtiveram 30% de prenhez.

A visualização da junção útero tubárica (papila) durante a inseminação histeroscópica, com auxílio de um endoscópio, permite a deposição de um pequeno número de espermatozóides diretamente sobre a papila (Morris et al., 2000a). Sendo a inseminação histeroscópica uma técnica promissora, que poderá ser utilizada no processo de reprodução assistida para o manejo reprodutivo de garanhões com problemas de fertilidade, que possuem baixa motilidade do sêmen, bem como uma alternativa para a maximização do uso do sêmen congelado. Esta técnica também pode viabilizar a obtenção de produtos de éguas que possuem problemas de transporte de espermatozóides no útero, o que é comum em éguas velhas (Scott et al., 1995).

A incidência de endometrite após a ihisteroscopia é muito pequena, apenas 1% de 78 éguas inseminadas com sêmen fresco (Morris et al., 2000a) e 3,5% de 86 éguas inseminadas com sêmen congelado (Morris et al., 2000b), através de histeroscopia, apresentaram acúmulo de líquido no lúmen uterino, mostrando que esta técnica é pouco invasiva.

Rath et al. (2000) trabalharam com inseminação artificial intra-uterina em suínos com objetivo de se conhecer o número mínimo de espermatozóides que pode ser depositado

na ponta do corno uterino para obtenção de bons índices de fertilidade. As inseminações foram realizadas por via cirúrgica e com concentrações de 1×10^9 , 2×10^8 , 2×10^7 , 1×10^7 , 2×10^6 espermatozóides por animal em um volume de 0,5 ml. Não houve diferença nas taxas de fertilização dos quatro primeiros grupos respectivamente, porém uma redução de 50% na taxa de fertilização foi observada com quantidade menores de espermatozóides.

Foi desenvolvido uma técnica de inseminação não cirúrgica que permite a deposição de espermatozóides na junção útero tubárica de porcas, com auxílio de uma pipeta de inseminação modificada e um fibroendoscópio flexível, sendo que com esta técnica é possível passar o canal cervical e alcançar a papila entre três e sete minutos em 90% dos animais. Através desta técnica foram realizadas inseminações com doses de 1000, 200 e 50×10^6 espermatozóides diluídos em cinco mL e as taxas de prenhez (tamanho das ninhadas) foram respectivamente de 86,6% (9,6), 88,9% (9,75) e 92,3% (9,4), não havendo diferença significativa na percentagem de prenhez e tamanho da ninhada entre as diferentes concentrações de espermatozóides utilizadas (Martinez et al., 2000). Roca et al. (2002) avaliaram a eficiência da inseminação com fibroendoscópio flexível utilizando um baixo número de espermatozóides provenientes de sêmen congelado de suínos e obtiveram uma taxa de prenhez de 70% com 9,2 leitões em média, sendo que no grupo controle, em que foi utilizado sêmen fresco a taxa de prenhez foi de 84,21% e a média de leitões foi de 9,2, não havendo diferença significativa entre os grupos, mostrando que a deposição do sêmen sobre a junção útero tubárica é eficiente.

Em um estudo realizado por Wolken et al. (2002) observaram que a deposição de um número reduzido de espermatozóides na parte distal do corno uterino de porcas, através de pipeta especial, é uma técnica eficiente, pois obtiveram 65,2% e 77,3% de prenhez utilizando 100×10^6 e 500×10^6 espermatozóides respectivamente. Utilizando uma técnica não cirúrgica de inseminação artificial em suínos, onde o sêmen é depositado na região anterior do corno uterino, Vazquez et al. (2002) verificaram a taxa de prenhez e tamanho da leitegada, utilizando sêmen sexado e obtiveram os seguintes resultados, 43,8% de prenhez e 8,2 leitões em média utilizando 50×10^6 espermatozóides sexados, 76,2% de prenhez e 9,6 leitões com 50×10^6 espermatozóides não sexados, 57,5% de prenhez e 9,1 leitões com 100×10^6 espermatozóides sexados e 81,1% de prenhez e 9,4 leitões utilizando 100×10^6 espermatozóides não sexados. Entretanto, Grossfeld et al. (2005) obtiveram taxas de prenhez e tamanhos de ninhadas inferiores do que as obtidas por Vazquez et al. (2002), utilizando a mesma técnica, sendo de 33% a taxa de prenhez e 7,5 leitões por ninhada quando as porcas

foram inseminadas com 50×10^6 espermatozóides sexados e de 54,5% de prenhez com 9,0 leitões por ninhada quando utilizou-se 50×10^6 espermatozóides não sexados.

Em suínos, a inseminação próximo ao oviduto, através de laparotomia tem apresentado bons resultados tanto com sêmen fresco quanto congelado (Krueger et al., 1999), mas a cirurgia resulta em um estresse para o animal e também causa aderências complicando a manipulação nos ciclos subsequentes (Fantinati et al., 2005)

Fantinati et al. (2005) inseminando marrãs, através de laparoscopia, obtiveram taxas de fertilização de 94,5%, 91,2%, 92,3%, 81,9% e 50,5% utilizando doses inseminantes de $1,5 \times 10^8$, $1,5 \times 10^7$, 1×10^7 , 5×10^6 e 1×10^6 respectivamente. Os autores concluíram que a inseminação laparoscópica, próximo à junção útero-tubárica em marrãs, pode ser extremamente eficiente na obtenção de altas taxas de fertilização utilizando baixas doses de sêmen, desde que a dose inseminante seja superior a 1×10^6 espermatozóides.

Novas técnicas de inseminação artificial também têm sido estudadas em ovelhas, visando à obtenção de melhores resultados com a aplicação do sêmen congelado. Maxweel et al. (1993) utilizando um método laparoscópico, obtiveram uma taxa de gestação maior com inseminações no oviduto (61%), quando comparada com as inseminações intrauterinas (39%) em ovelhas. Pau et al. (2002) compararam a inseminação por laparoscopia com a transcervical, sendo ambas cirúrgicas e concluíram que a eficiência das técnicas foram similares, mas a inseminação transcervical causa menos estresse para o animal.

Em bovinos também tem sido proposta a deposição do sêmen na extremidade do corno uterino, com objetivo de aumentar a eficiência da inseminação artificial, reduzir o número de espermatozóides requeridos por dose inseminante, aumentando assim o aproveitamento de touros geneticamente superiores, bem como melhorar o potencial de uso do sêmen sexado (Lopez-Gatius, 2000).

Uma precisa relação entre o sítio de inseminação e o número de espermatozóides por dose inseminante, ainda não está bem definida em vacas (Kurykin et al., 2003). Foote & Karroth (1997) obtiveram uma taxa de prenhez similar realizando inseminações com $4,6 \times 10^6$ (70,5%) e $21,6 \times 10^6$ (70,1%) espermatozóides móveis. Entretanto, Gerard & Humblot (1991) obtiveram uma taxa de prenhez significativamente maior quando utilizaram 16×10^6 espermatozóides do que utilizando doses inseminantes de 8×10^6 e 12×10^6 espermatozóides.

Em vacas a deposição do sêmen próximo a junção útero-tubárica pode resultar em mais espermatozóides alcançando o sítio de fertilização, aumentando assim a chance de polispermia (Hunter & Greve, 1998). Dalton et al. (1999) encontraram mais espermatozóides na zona pelúcida após a inseminação na extremidade do corno uterino do que após a

inseminação no corpo do útero (inseminação convencional). Entretanto, Hawk & Tanabe (1986) não encontraram um aumento no número de espermatozóides acessórios após a inseminação na extremidade do corno uterino.

De acordo com Seidel et al. (2000) a deposição do sêmen mais próximo do sítio de fertilização, em vacas, permitiu a utilização de um número reduzido de espermatozóides sem afetar drasticamente a fertilidade. Senger et al. (1988) observaram que a taxa de prenhez das vacas inseminadas no corpo do útero foi de 43% enquanto que nos animais inseminados no corno ipsilateral ao folículo pré-ovulatório a taxa foi de 65%. Entretanto, McKenna et al. (1990) não constataram vantagens em utilizar esta técnica. Hylan et al. (2002) desenvolveram um experimento para avaliar a taxa de fertilização e qualidade dos embriões recuperados de vacas superovuladas inseminadas com sêmen congelado, através da deposição do sêmen próximo ao sítio de fertilização por um guia ultra-sonográfico intravaginal, com um baixo número de espermatozóides e concluíram que esta técnica não é eficiente para produção de embriões de vacas superovuladas.

Kurykin et al. (2003) desenvolveram um experimento para avaliar o efeito do local de deposição do sêmen e dose inseminante em novilhas, com estro sincronizado e obtiveram uma taxa de prenhez de 68,1% no grupo em que foram realizadas inseminações na extremidade do corno uterino com 2×10^6 espermatozóides, 60,9% quando as inseminações foram realizadas com 40×10^6 espermatozóides na extremidade do corno uterino, 67,9 % quando as inseminações foram realizadas na porção média do corno uterino com 2×10^6 , 53,6% quando as inseminações foram realizadas na porção média do corno uterino com 40×10^6 espermatozóides e 54,2% quando as inseminações foram realizadas no corpo do útero com 40×10^6 espermatozóides, mostrando que a inseminação na extremidade do corno uterino, com 2×10^6 espermatozóides, em novilhas sincronizadas é tão eficiente quanto a inseminação convencional com 40×10^6 espermatozóides.

Andersson et al. (2004) avaliaram a taxa de prenhez em vacas de leite utilizando inseminações com 2 e 15×10^6 espermatozóides, oriundos de sêmen congelado, em diferentes sítios de deposição do sêmen e observaram que as inseminações com baixa dose resultaram em taxa de prenhez significativamente menor do que com o uso da dose normal e que o local de deposição do sêmen não influenciou nas taxas de gestação. Observou-se também uma grande variabilidade na fertilidade entre os touros, utilizando 2×10^6 espermatozóides por dose e também um efeito significativo dos efeitos touro e técnico, na fertilidade das vacas.

Trabalhando com sêmen fresco de equinos, Buchanan et al. (1999) compararam as taxas de prenhez de grupos de éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides em 20 ml no

corpo do útero, 25×10^6 em 1,0 ml, 5×10^6 em 1,0 ml e 5×10^6 em 0,2 ml depositados na ponta do corno através do desvio da pipeta. Os resultados foram respectivamente de 90%, 57%, 30% e 40%, concluindo que a deposição de sêmen no corno uterino pode maximizar a fertilidade quando utiliza-se um baixo número de espermatozóides em um pequeno volume.

Dell'Aqua (2001) avaliaram o efeito do local de deposição do sêmen e a concentração da dose inseminante e obtiveram 20% de prenhez com a deposição de 50×10^6 espermatozóides pré-ovulação no corpo do útero e nenhuma prenhez com a deposição do mesmo número de gametas na extremidade do corno, onde este local foi atingido desviando-se a pipeta de inseminação por manipulação retal. Com a deposição de 150×10^6 espermatozóides pré e 150×10^6 pós ovulação obtiveram 40% de prenhez quando o sêmen foi depositado no corpo do útero e 50% quando o sêmen foi depositado na extremidade do corno, não sendo observado diferença estatística entre os grupos com diferentes locais de deposição do sêmen.

Em um estudo desenvolvido com objetivo de avaliar a eficiência da inseminação histeroscópica, sobre a papila e inseminação na extremidade do corno uterino, utilizando um baixo número de espermatozóides (5×10^6 / 200 μ L) após 24 horas de refrigeração, bem como avaliar o efeito do tratamento intrauterino com prostaglandina E₂ (PGE₂) antes da inseminação, Brinsko et al. (2003) não observaram interação entre os tratamentos pré-inseminação (solução fisiológica x PGE₂) e as técnicas de inseminação utilizadas (histeroscopia x extremidade do corno). A taxa de prenhez não foi diferente entre as éguas inseminadas por histeroscopia (67%) ou na extremidade do corno (56%). A taxa de prenhez também não foi diferente entre o grupo tratado com PGE₂ (61%) e o não tratado (61%), mostrando que a infusão com 0,25 mg de PGE₂ na extremidade do corno uterino 2 horas antes das inseminações não interferiu nas taxas de prenhez de nenhuma das técnicas de inseminação utilizada.

Squires et al. (2000) avaliaram o local de deposição do sêmen e o número de espermatozóides utilizados e observaram que a inseminação histeroscópica resultou em uma maior taxa de prenhez com a aplicação de 5 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva (50%), do que com o desvio da pipeta para a extremidade do corno uterino (Zero %). Entretanto, em outro trabalho não foi observado diferença significativa na taxa de prenhez de éguas inseminadas na extremidade do corno uterino (50%) e éguas inseminadas por histeroscopia (62%) com 5×10^6 espermatozóides, oriundos de sêmen refrigerado (Rigby et al., 2001).

Manning et al. (1998) utilizando a técnica de histeroscopia na tentativa de canulação do oviduto de éguas para deposição do sêmen no interior da tuba uterina, obtiveram 33% de fertilidade inseminando com 1×10^6 espermatozóides. Entretanto, McCue et al. (2000) não encontraram diferença estatística na porcentagem de prenhez entre a inseminação com sêmen fresco de eqüinos utilizando 500×10^6 espermatozóides com motilidade progressiva, no corpo do útero (40%) e a porcentagem de prenhez obtida com 50 mil espermatozóides com motilidade progressiva, depositados no oviduto (21,4%), através de uma técnica de inseminação cirúrgica.

Trabalhando com transferência de ovócitos, Coutinho da Silva et al. (2001) em um dos grupos de éguas transferiram os ovócitos juntamente com 200 mil espermatozóides (sêmen fresco) para o oviduto das receptoras e em outro grupo as éguas receptoras foram inseminadas pelo método convencional, com 500×10^6 espermatozóides móveis, antes dos ovócitos serem transferidos para os ovidutos e não observaram diferença na taxa de prenhez dos grupos. Porém, a inseminação no oviduto de éguas não é um método prático, pois é um processo bastante invasivo.

A inseminação diretamente no oviduto é eficiente quando se utiliza sêmen fresco para fertilização dos ovócitos na transferência de ovócitos. A taxa de prenhez é significativamente menor quando se realiza a inseminação no oviduto com sêmen congelado (8%) quando comparada com sêmen fresco (82%). Bem como, com a utilização de sêmen refrigerado, a taxa de prenhez é maior quando se realiza inseminação intrauterina (83%) do que inseminação direta no oviduto (25%) (Coutinho da Silva et al., 2004).

Visando comparar os resultados obtidos através da inseminação convencional e histeroscópica, com baixo número de espermatozóides, Leão et al. (2002) desenvolveram um experimento onde as éguas foram inseminadas com 10×10^6 espermatozóides móveis sobre a junção útero-tubárica, 10×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero e 400×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero e as taxas de prenhez foram de 41,67%, 16,67% e 50% respectivamente, mostrando que a inseminação histeroscópica proporciona bons resultados, mesmo utilizando apenas 2,5% da dose convencional, utilizando sêmen fresco de garanhões.

Morris et al. (2000a) desenvolveram um experimento objetivando avaliar o índice de fertilidade de éguas inseminadas com baixo número de espermatozóides sobre a papila tubárica, por histeroscopia, ipsilateral ao ovário contendo o folículo pré ovulatório. O sêmen era coletado 4 horas antes da inseminação, diluído (2:1 com meio Kenney) e mantido por 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C). O sêmen diluído era centrifugado em Percoll 45 e

90% a 200g por 5 minutos e subseqüentemente a 800g por 10 minutos. O pellet formado era ressuspendido em 900 µl de meio contendo Hepes e então era determinada a concentração para ajuste final do volume inseminante com diferentes quantidades de espermatozóides utilizados em cada grupo. As éguas nos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram inseminadas uma vez com respectivamente 10×10^6 , 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,1 \times 10^6$, $0,001 \times 10^6$ espermatozóides móveis selecionados em Percoll. As taxas de prenhez foram respectivamente de 60%, 75%, 64%, 29%, 22% e 10%, concluindo que a inseminação de éguas com um número reduzido de espermatozóides selecionados em Percoll, pode resultar em altas taxas de fertilidade, e observaram que são necessários pelo menos $1,0 \times 10^6$ células para se obter uma taxa de concepção adequada. As melhores taxas de prenhez obtidas neste experimento quando comparadas com os resultados de Vazquez et al. (1998) e Manning et al. (1998), que foram respectivamente de 33% com $3,8 \times 10^6$ espermatozóides com motilidade progressiva e 22% com $1,0 \times 10^6$, podem ser explicadas pela centrifugação do sêmen em gradiente de Percoll, que promoveu uma seleção dos espermatozóides.

Leão (2002) desenvolveu um experimento com objetivo de avaliar a eficiência da inseminação histeroscópica utilizando sêmen congelado de garanhões, bem como verificar se a seleção de espermatozóides em gradiente descontínuo de Percoll (45% e 90%) poderia melhorar os índices de fertilidade obtidos com sêmen congelado. As inseminações foram realizadas pós-ovulação, sendo que no primeiro grupo as éguas foram inseminadas com 10×10^6 espermatozóides móveis não selecionados em Percoll, por histeroscopia, no segundo grupo com 10×10^6 espermatozóides móveis selecionados em Percoll, também por histeroscopia e no terceiro grupo com 400×10^6 espermatozóides móveis, por inseminação convencional (corpo do útero). As taxas de fertilidade foram respectivamente de 33%, 33% e 0%, mostrando que a inseminação histeroscópica é eficiente quando se utiliza uma baixa dose de sêmen congelado de garanhões, porém a seleção de espermatozóides em gradiente de Percoll não resultou em melhoria nos índices de fertilidade.

Em um estudo realizado por Nie et al. (2003) constatou-se que a inseminação na extremidade do corno uterino de éguas pode levar a bons índices de fertilidade, utilizando uma baixa dose inseminante (25×10^6 espermatozóides). De acordo com os autores, esta técnica de inseminação pareceu reduzir a reação inflamatória pós-inseminação. Neste experimento não foi observado diferença estatística nos índices de fertilidade, das éguas inseminadas com sêmen selecionado em colunas de esferas de vidro e sephadex (50%), com

sêmen selecionado em Percoll (43%) e com sêmen não selecionado (33%). Entretanto, a seleção de espermatozóides em colunas de Sephadex para a inseminação artificial na extremidade do corno uterino, tendeu a melhorar a fertilidade em relação as éguas inseminadas com espermatozóides não selecionados.

Com o objetivo de comparar as taxas de prenhez de éguas inseminadas com sêmen fresco na extremidade do corno por desvio de pipeta com éguas inseminadas por histeroscopia, Lindsey et al. (2000) desenvolveram um experimento onde um grupo de éguas foi inseminado com 5×10^6 de espermatozóides no ápice do corno, um segundo grupo foi inseminado com 5×10^6 sobre a papila e o terceiro grupo foi inseminado com 5×10^6 de espermatozóides sexados sobre a papila. A inseminação histeroscópica resultou em 50% de prenhez e a inseminação na extremidade do corno não resultou em prenhez. A taxa de prenhez do grupo inseminado com sêmen sexado foi de 25%. Neste mesmo trabalho foi comparado a fertilidade do sêmen sexado e não sexado, fresco e congelado e obtiveram os seguintes resultado de fertilidade, sêmen fresco não sexado 40%, sêmen fresco sexado 37,5%, sêmen congelado não sexado 37,5% e sêmen congelado sexado 13%.

Lindsey et al. (2001) desenvolveram um experimento com objetivo de comparar a fertilidade de espermatozóides que foram sexados logo após a coleta com a fertilidade de espermatozóides os quais foram refrigerados a 20°C por 18 horas e depois sexados. As éguas de ambos os grupos foram inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia e as taxas de prenhez foram respectivamente de 30% e 35%, mostrando que a refrigeração do sêmen antes do processo de sexagem por citometria de fluxo, não afeta a fertilidade do sêmen.

Em um estudo subsequente Lindsey et al. (2005) avaliaram a eficiência das inseminações histeroscópica e na extremidade do corno uterino, utilizando 20×10^6 espermatozóides em 300µL, oriundos de sêmen sexado por citometria de fluxo, após 18 horas de refrigeração a 15°C ou 5°C. Embora a porcentagem de prenhez das éguas inseminadas por histeroscopia, com sêmen sexado após refrigeração a 15°C (72%) ter sido numericamente maior do que as éguas inseminadas com o sêmen sexado após refrigeração a 5°C (55%), não houve diferença estatística entre os grupos. Não houve diferença estatística entre as técnicas de inseminação utilizadas, com a aplicação do sêmen refrigerado a 5°C, sendo 38% a porcentagem de prenhez do grupo em que as éguas foram inseminadas na extremidade do corno uterino. Os pesquisadores acreditam que a diferença numérica das taxas de prenhez entre as técnicas de inseminação utilizadas, seja em decorrência de uma maior irritação do endométrio causada pelo desvio da pipeta do que a irritação causada pelo endoscópio. O

volume utilizado para a realização das inseminações também pode ter exercido um efeito no resultado das inseminações, pois o volume utilizado foi menor que 0,5 mL, sendo mais preciso a deposição deste volume de sêmen diretamente sobre a junção útero-tubárica, através de um endoscópio.

As taxas de concepção ao primeiro ciclo de éguas inseminadas com sêmen congelado tem sido de 30 a 60%, quando se faz avaliações ultrasonográficas para controle do desenvolvimento folicular freqüentemente e a inseminação é feita com um mínimo de 200×10^6 espermatozóides móveis com no máximo 6 horas da ovulação (Squires et al., 2000). Morris et al. (2000) inseminaram éguas por histeroscopia com baixo número de espermatozóides provenientes de sêmen congelado, sendo a inseminação realizada em tempo fixo após a aplicação de hCG. A aplicação de hCG era feita nas éguas que apresentavam folículos maiores que 35 mm de diâmetro e a inseminação entre 32 e 34 horas após a aplicação de hCG com 25×10^6 de espermatozóides móveis provenientes do ejaculado em 500 μ l, 5×10^6 espermatozóides do ejaculado em 100 μ l, 300×10^6 espermatozóides provenientes do epidídimo em 500 μ l e 5×10^6 espermatozóides do epidídimo em 100 μ l. As taxas de prenhez foram respectivamente de 64%, 79%, 16% e 0%, concluindo que a inseminação histeroscópica com a deposição de 1% da dose convencional para sêmen congelado proveniente do ejaculado de garanhões é eficiente.

Petersen et al. (2002) avaliaram a taxa de recuperação embrionária de éguas inseminadas na extremidade do corno uterino, 12 e 36 horas após a aplicação de hCG com 50×10^6 espermatozóides móveis, oriundos de sêmen congelado e éguas inseminadas no corpo do útero, 12 horas após a aplicação de hCG com 500×10^6 espermatozóides móveis, oriundos de sêmen fresco, sendo as mesmas inseminadas novamente após 24 horas com 500×10^6 espermatozóides móveis, oriundos de sêmen refrigerado do mesmo ejaculado utilizado na primeira inseminação e obtiveram uma taxa de recuperação embrionária de 64% e 37% respectivamente, mostrando que a inseminação na extremidade do corno uterino 12 e 36 horas após a aplicação de hCG, pode resultar em boa taxa de recuperação embrionária, utilizando uma baixa dose de sêmen congelado de garanhões.

Em um estudo desenvolvido por Squires et al. (2002), utilizando sêmen congelado, no qual foram comparadas as taxas de recuperação embrionária de éguas inseminadas com 200×10^6 espermatozóides no corpo do útero e no corno uterino, os pesquisadores observaram que a taxa de recuperação embrionária foi menor quando as éguas foram inseminadas no corno uterino (20%) do que as éguas inseminadas no corpo do útero (50%). Neste mesmo trabalho observou-se que a taxa de recuperação embrionária de éguas

inseminadas no corpo do útero com 800×10^6 espermatozóides, com no máximo 6 horas após a ovulação (60%), não foi diferente da taxa de recuperação embrionária das éguas inseminadas com 400×10^6 espermatozóides, 24 e 40 horas após a aplicação de hCG (55%) e a incidência de éguas com acúmulo de líquido no útero, 24 horas após as inseminações, foi similar entre estes grupos, mostrando que a realização de duas inseminações por ciclo não resulta em endometrite pós-cobertura grave.

Güvenc et al. (2005) realizaram um experimento onde compararam a reação inflamatória no útero de éguas normais, 24 horas após a inseminação artificial com sêmen congelado nos seguintes grupos, inseminação na ponta do corno uterino com 20×10^6 espermatozóides, inseminação na ponta do corno com 200×10^6 espermatozóides, inseminação no corpo uterino com 20×10^6 espermatozóides e inseminação no corpo do útero com 200×10^6 espermatozóides e concluíram que nem o local da inseminação e a dose inseminante afetaram a magnitude da reação inflamatória uterina, avaliada pela contagem de polimorfonucleares no fluido uterino de éguas normais 24 horas após a inseminação, sugerindo que a inseminação artificial na ponta do corno não aumenta os riscos de endometrite. O grupo que foi inseminado com baixa dose na ponta do corno apresentou uma quantidade de líquido no útero significativamente menor do que os demais grupos, mostrando que esta técnica não é traumática ou irritante, com a deposição de um baixo número de espermatozóides.

Morris & Allen (2002) concluíram que tanto a inseminação histeroscópica quanto a inseminação na extremidade do corno uterino, através de desvio de pipeta, podem melhorar a eficiência reprodutiva com a aplicação do sêmen congelado e sexado de garanhões férteis e que as taxas de concepção parecem ser melhores com a inseminação histeroscópica quando a dose inseminante é menor que 5×10^6 espermatozóides.

Em éguas, a inseminação histeroscópica com 150×10^6 espermatozóides do epidídimo (sêmen fresco), resultou em uma taxa de prenhez de 45% (Morris et al., 2002b). Neste mesmo estudo, uma maior taxa de prenhez foi obtida com a inseminação histeroscópica (18%) do que com a inseminação convencional (8%), utilizando 200×10^6 espermatozóides congelados do epidídimo.

Com objetivo de avaliar os efeitos da técnica de inseminação, dose inseminante, volume inseminante e tipo de sêmen (fresco ou congelado) sobre a fertilidade de éguas normais e éguas com problemas reprodutivos, Sieme et al. (2004) desenvolveram um experimento em que realizaram inseminações no corpo do útero com 50×10^6 espermatozóides móveis, oriundos de sêmen fresco, em um volume de 12 ml (58,1% de prenhez), inseminações na extremidade do corno uterino, através de desvio de pipeta com 50×10^6

espermatozoides móveis, oriundos de sêmen fresco, em 12 ml (50,0% de prenhez), inseminações histeroscópicas com 50×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen fresco, em 12 ml (55,6% de prenhez), inseminações histeroscópicas com 50×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen fresco, em 2 ml (67,9% de prenhez), inseminações no corpo do útero com 300×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen fresco, em 12 ml (58,8% de prenhez), inseminações no corpo do útero com 100×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen congelado, em 0,5 ml (43,3% de prenhez), inseminações na extremidade do corno uterino com 100×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen congelado, em 0,5 ml (44,7% de prenhez), inseminações histeroscópicas com 100×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen congelado, em 0,5 ml (45,8% de prenhez) e inseminações no corpo do útero com 800×10^6 espermatozoides móveis, oriundos de sêmen congelado, em 12 ml (42,9% de prenhez), não sendo observado diferença estatística entre os grupos.

Sieme et al. (2004) observaram que em éguas com problemas reprodutivos, a inseminação artificial com sêmen congelado apresentou uma taxa de prenhez significativamente menor do que a inseminação com sêmen fresco. Em éguas normais a inseminação histeroscópica com sêmen fresco, resultou em taxa de prenhez melhor do que a inseminação no corpo do útero, mas em éguas problemas a taxa de prenhez foi melhor quando as éguas foram inseminadas no corpo do útero, quando comparada com as taxas de prenhez obtidas através de inseminações histeroscópicas e na ponta do corno uterino. Neste mesmo trabalho observou-se que de todas as éguas inseminadas com sêmen fresco, 8,5% apresentaram acúmulo de líquido após a inseminação e 11,1% das éguas inseminadas com sêmen congelado apresentaram acúmulo de líquido. Observou-se também que a perda embrionária foi de 10,5% nas éguas inseminadas com sêmen fresco no corpo do útero, 0% nas éguas inseminadas na ponta do corno com sêmen fresco, 8,8% nas éguas inseminadas por histeroscopia com sêmen fresco, 16% nas éguas inseminadas no corpo do útero com sêmen congelado, 11,7% nas éguas inseminadas na ponta do corno com sêmen congelado e 9,1% nas éguas inseminadas por histeroscopia com sêmen congelado, não sendo observado diferença estatística entre os grupos.

A inseminação intrauterina guiada por ultra-som transvaginal é uma técnica na qual o corno uterino é posicionado junto ao fundo de vagina por manipulação retal e através de uma agulha perfura-se o fundo de vagina e a extremidade do corno uterino, para que o sêmen seja depositado no lúmen uterino. Esta técnica de inseminação tem sido desenvolvida em éguas e pode ser uma alternativa para a inseminação artificial com baixa dose. Silva et al.

(2004) obtiveram 50% de prenhez inseminando 10 éguas com 20×10^6 espermatozóides móveis, através desta técnica.

Outra técnica que também pode ser eficiente para aproximação dos espermatozóides do sítio de fertilização é a inseminação intraperitoneal, ultrapassando a fase de seleção espermática que ocorre durante o transporte espermático pelo útero, como já foi demonstrado em suínos (Rowlands, 1957), coelho (Adams, 1969), macacos (Van Pelt, 1970) e mulheres (Crosignani et al., 1991).

Mroueh et al. (1966) realizaram inseminação intraperitoneal em coelhos e conseguiram recuperar espermatozóides no oviduto, mas não quantificaram. Acredita-se que um alto número de espermatozóides no oviduto de coelhas pode causar uma polispermia e uma subsequente redução na implantação dos embriões (Adams, 1969).

Pesquisas com macacas mostraram que a inseminação artificial intraperitoneal pode ser eficiente em primatas, sendo as taxas de fertilização melhores com a utilização de mais de 50 mil espermatozóides por inseminação (Van Pelt, 1970).

Vanden Bosch et al. (1974) desenvolveram um experimento para determinar a distribuição dos espermatozóides no interior do oviduto de coelhas após a inseminação intraperitoneal e correlacionaram com a viabilidade do sêmen utilizado. As inseminações intraperitoneais foram realizadas com 200×10^6 espermatozóides com sêmen de boa qualidade (motilidade maior que 80%) e com espermatozóides imóveis e observaram que os espermatozóides móveis são mais eficientes e conseguem penetrar no oviduto com mais facilidade, sendo que a maioria dos espermatozóides recuperados encontravam-se na região da ampola.

A inseminação intraperitoneal é uma técnica usual em Medicina Humana, em que o sêmen é depositado sobre o ovário através de perfuração do fundo de vagina sendo a agulha guiada por ultra-som, para o tratamento de casais com problemas de fertilidade por causa desconhecida, baixa qualidade do sêmen, problemas de tuba uterina e cervix (Hovatta et al., 1990). A inseminação intraperitoneal parece ser uma técnica eficiente e é uma alternativa não traumática especialmente para casos de oligoastenozoospermia severa (Ragni et al., 1990). Lesec et al. (1989) relataram uma taxa de gestação de 7% em casais em que os homens possuíam problemas de fertilidade de causa desconhecida.

A inseminação intraperitoneal em humanos consiste na injeção de espermatozóides selecionados (lavados) na cavidade abdominal. Esta preparação do sêmen pode remover alguns fatores imunossupressores do plasma, mas também reduz a quantidade de proteínas estranhas ao sistema imune feminino. Critser et al. (1989) avaliaram a presença de anticorpos

em 9 mulheres e 8 apresentaram resultados positivos após 2 ciclos de inseminação intraperitoneal e Crosignani et al. (1991) encontraram anticorpos em 20 de 108 pacientes após 15 e 90 dias da inseminação intraperitoneal.

A deposição do sêmen na cavidade abdominal sobre o ovário em mulheres usualmente é combinada com programas de superovulação, o que não permite definir o quanto os resultados de fertilidade são atribuídos à técnica de inseminação e o quanto é devido as múltiplas ovulações. Entretanto, Ragni et al. (1990) relataram o primeiro caso de gestação após a inseminação intraperitoneal durante um ciclo natural.

Em um estudo realizado por Hovatta et al. (1990), foi comparada a eficiência da inseminação artificial intraperitoneal e intra-uterina, em casais com problemas de fertilidade. Foram utilizados 124 casais em 326 ciclos, sendo ambas as técnicas associadas com protocolos de superovulação. A taxa de gestação por casal foi de 24% com a técnica de inseminação intraperitoneal e de 31% com a inseminação intra-uterina, não existindo diferença estatística entre as técnicas avaliadas. Entretanto, as taxas de gestação de ambos os tratamentos foram significativamente maiores do que a taxa de gestação observada no ciclo controle de cada grupo.

Livi et al. (1990) avaliaram a presença de anticorpos contra espermatozóides em mulheres, após a inseminação artificial intraperitoneal, pois a presença destes anticorpos causa problemas de fertilidade. Estes autores detectaram a presença de anticorpos contra espermatozóides, sendo que esta produção de anticorpos poderia ser apenas uma resposta transitória ou o primeiro passo para uma imunidade sistêmica. Esta última hipótese citada pode explicar o decréscimo observado nas taxas de gestação, quando as mulheres eram inseminadas mais de uma vez por esta técnica de inseminação.

Com objetivo de avaliar o aparecimento de anticorpos contra espermatozóides em mulheres, inseminadas uma ou mais vezes por inseminação intraperitoneal, Ragni et al. (1993) realizaram um experimento e constataram que apesar do grande número de espermatozóides (14×10^6) utilizados, não foi observado formação de anticorpos, mesmo após a realização de inseminações subsequentes.

A inseminação intraperitoneal foi introduzida como tratamento de subfertilidade humana com resultados satisfatórios. Evans et al. (1991) constataram que a inseminação artificial intraperitoneal em combinação com a superovulação pode oferecer bons resultados de gestação em casais com problemas de fertilidade, principalmente em casais subférteis por causa desconhecida. Observaram uma taxa de gestação por ciclo de 3,1% no ciclo controle, 3,5% com a inseminação intrauterina e de 11,9% com a inseminação intraperitoneal.

Realizando inseminação intraperitoneal em casais com problemas de fertilidade por causa desconhecida, Karlström et al. (1991) obtiveram uma taxa de gestação de 11,7% e 11,1% utilizando a seleção espermática em hialuronato de sódio e seleção em swim-up respectivamente.

Crosignani et al., (1991) experimentaram a inseminação intraperitoneal para o tratamento de infertilidade de homens de origem desconhecida e conseguiram 23 gestações de 164 ciclos, utilizando aproximadamente 1×10^6 espermatozóides.

Turhan et al. (1992) obtiveram bons resultados com inseminação intraperitoneal e concluíram que a deposição do sêmen na cavidade abdominal sobre o ovário, tem um resultado favorável para problemas de fertilidade relacionados com a qualidade do sêmen e quando a origem da infertilidade é imunológica. Entretanto, Campos-Liete et al. (1992) não encontraram efeito benéfico da inseminação intraperitoneal em relação ao ciclo controle.

Tiemessen et al. (1997) compararam as técnicas de inseminação intraperitoneal e intrauterina em casais com problemas de fertilidade de causa conhecida e observaram que a taxa de gestação por ciclo (24% x 16%) e acumulada (53% e 40%) foi significativamente maior com a inseminação intrauterina.

O uso de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), gonadotrofina menopausal humana (hMG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) associados com a técnica de inseminação intraperitoneal, melhorou a taxa de concepção de mulheres com problemas de fertilidade por causa desconhecida, as quais foram submetidas a este protocolo após sucessivas tentativas de superovulação e inseminação intrauterina (Minoura et al., 1999).

É aceito que em algumas espécies, os espermatozóides passam pelo oviduto e atingem a cavidade abdominal após a monta natural ou inseminação e acredita-se que durante o trajeto dos espermatozóides pelo trato reprodutivo feminino, o mesmo separa-se dos outros componentes do plasma seminal, reduzindo assim a chance de ocorrer uma resposta imune ou até mesmo uma infecção (López-Gatius, 1995).

López-Gatius (1995) realizou inseminação intraperitoneal em vacas de leite com problemas de fertilidade, as quais já tinham sido inseminadas no mínimo 6 vezes e possuíam mais de 250 dias de paridas, através de perfuração do fornix vaginal onde a agulha era guiada por ultra-som e não observou diferença estatística entre as porcentagens de prenhez da inseminação intraperitoneal (14,6%) e intrauterina (20,6%), utilizando sêmen congelado. Neste experimento o sêmen utilizado foi diluído com meio citrato-gema de ovo e antibióticos. A injeção do sêmen na cavidade peritoneal era realizada por perfuração do fornix vaginal, e a deposição era sobre o ovário ipsilateral a ovulação.

Com objetivo de avaliar o transporte espermático retrógrado em vacas de leite, após a inseminação artificial intraperitoneal, López-Gatius & Yániz (2000) desenvolveram um experimento onde inseminaram 36 vacas por inseminação intraperitoneal com espermatozóides vivos (n=18) e espermatozóides mortos (n=18). Cada grupo de 6 vacas foi inseminado aleatoriamente com 30, 45 e 90×10^6 espermatozóides. Após 2, 6, 12 e 24 horas após a inseminação avaliava-se a taxa de recuperação espermática do muco cervical. Das vacas inseminadas pela técnica intraperitoneal, recuperou-se espermatozóides do muco cervical de 6 a 24 horas após a inseminação com 90×10^6 espermatozóides, sendo maior a recuperação nos grupos em que utilizou-se espermatozóides mortos. Não sendo recuperados espermatozóides dos grupos em que as vacas foram inseminadas com 30 e 45×10^6 espermatozóides. Os autores sugeriram que após a inseminação artificial intraperitoneal, existe um transporte passivo da cavidade abdominal para o trato genital feminino e que existe uma alta retenção de espermatozóides no trato genital quando espermatozóides vivos são utilizados na inseminação.

De acordo com Yaniz et al. (2002) a inseminação artificial intraperitoneal oferece algumas vantagens, como a ausência de barreiras para os espermatozóides (muco cervical e junção útero-tubárica) e o aumento do número de espermatozóides próximo ao sítio de fertilização e apresenta também algumas desvantagens, como o efeito deletério do ambiente peritoneal sobre os espermatozóides, dispersão das células espermáticas na cavidade abdominal, risco de polispermia, infecções e aquisição de imunidade às células espermáticas. Estes autores também enfatizam a importância da utilização de uma alta dose inseminante em todas as espécies, para se conseguir melhores resultados de concepção com o uso desta técnica.

Mununce et al. (2003) avaliou o efeito do líquido peritoneal sobre alguns parâmetros da função espermática, *in vitro* e observou que o líquido peritoneal não mata os espermatozóide, porém reduz a habilidade dos mesmos a responderem à indutores de reação acrossomal e de se ligarem à zona pelúcida de oócitos, indicando que este fluido pode modular a função espermática *in vivo*, podendo este ser um dos motivos que interferem no sucesso da técnica de inseminação intraperitoneal.

O melhor momento para se realizar a inseminação intraperitoneal é relativo de acordo com a capacitação, transporte espermático e momento da ovulação e varia entre as espécies. Em coelhas a inseminação deve ser realizada de 8 a 16 horas antes da ovulação e em porcas de zero a 12 horas antes da ovulação (Yaniz et al., 2002).

Os resultados de fertilidade obtidos com a aplicação da inseminação intraperitoneal nos diferentes mamíferos são muito variados e promissores. Entretanto, é claro que esta técnica está passando pelos primeiros estágios e é necessário um melhor entendimento dos fatores associados ao sucesso desta técnica, para que se possa incrementar o protocolo de realização da técnica.

Uma nova técnica de reprodução assistida tem sido desenvolvida e consiste na introdução direta dos espermatozóides no folículo pré ovulatório. Alguns autores acreditam que a fertilização pode ocorrer mais facilmente após a inseminação intrafolicular e que esta técnica também pode ser uma alternativa para o tratamento de fertilidade de origem masculina (Nuoju-Huttunen et al., 1995). Lucena et al. (1991) relataram o primeiro caso de gestação obtida através de inseminação intrafolicular, a qual foi realizada em uma mulher que apresentava aderência ovariana e que o marido apresentava azoospermia.

Zbella et al. (1992) relataram um caso de inseminação intrafolicular para tratamento de subfertilidade de origem masculina, o qual resultou em gestação. Neste relato o sêmen apresentava oligoastenozoospermia crônica com baixa concentração ($5 - 20 \times 10^6$ espermatozóides/ml) com 20 a 38% de motilidade e um volume entre 1 a 3,5 ml. Antes de tentar a inseminação intrafolicular outras técnicas foram tentadas como a fertilização *in vitro* e inseminação intrauterina, mas sem resultados positivos. Foi injetado lentamente no folículo 5×10^6 espermatozóides móveis em 30 μ l de HTF (human tubal fluid) que foi preparado previamente pelo protocolo de *Swim up*.

A eficiência da inseminação intrafolicular para o tratamento de infertilidade de origem não tubárica foi investigada por Nuoju-Huttunen et al. (1995), onde 50 mulheres com problemas de fertilidade e tuba uterina normal, foram submetidas a inseminação intrafolicular, em que os espermatozóides selecionados foram injetados em um folículo pré ovulatório via vaginal. A técnica de inseminação intrafolicular mostrou-se simples e conveniente, não havendo complicações e observaram que os resultados da inseminação intrafolicular quando comparados com outras técnicas de reprodução assistida são ineficientes para o tratamento de fertilidade. Estes autores acreditam que este baixo resultado de fertilidade pode ter sido consequência de alguns fatores como os espermatozóides terem sido depositados fora do folículo, o número de espermatozóides utilizados ter sido muito baixo, a inseminação ter sido realizada em momento inadequado com relação à aplicação do hCG e as condições do folículo não serem favoráveis para fertilização.

Na reprodução eqüina a inseminação artificial intrafolicular tem potencial aplicação para contornar situações como éguas que desenvolvem endometrite persistente pós-

cobertura, inseminações com número reduzido de espermatozóides, oriundos de ejaculados oligozoospermicos ou sêmen congelado, bem como aplicações em pesquisas para melhor entendimento do processo de fertilização (Meinjtes et al., 2001).

Meinjtes et al. (2001) desenvolveram um experimento com intuito de avaliar a eficiência da inseminação intrafolicular guiada por ultra-sonografia transvaginal em éguas. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo que no grupo I as éguas receberam hCG e foram inseminadas com espermatozóides tratados com agentes capacitantes, no grupo II as éguas receberam hCG e foram inseminadas com sêmen não tratado, no grupo III as éguas não receberam hCG e foram inseminadas com sêmen tratado com agentes capacitantes e no grupo IV as éguas não receberam hCG e foram inseminadas com sêmen não tratado. Todas as inseminações foram realizadas com 180×10^6 espermatozóides móveis em 1,5 mL. Das cinco éguas que receberam hCG (grupos I e II) todas ovularam e da cinco éguas que não receberam hCG apenas duas ovularam e não foi detectado prenhez em nenhum dos grupos. Os autores deste trabalho não sabem se o número de espermatozóides utilizados para a realização das inseminações foi insuficiente, se os espermatozóides permanessem livres no líquido folicular ou se ligam nas células da granulosa e se os espermatozóides são capazes de sobreviver no ambiente intrafolicular.

Eilts et al. (2002) desenvolveram um experimento para determinar se a inseminação artificial intrafolicular poderia interferir negativamente na obtenção de prenhez de éguas. Os animais recebiam uma aplicação de hCG e concomitantemente eram inseminadas no corpo do útero com $6,7 \times 10^9$ espermatozóides móveis. Depois de 30 a 34 horas da aplicação do hCG e inseminação convencional, realizava-se a inseminação artificial intrafolicular com 100×10^6 espermatozóides móveis em 2,0mL. Foi observado apenas uma prenhez das nove éguas inseminadas, tendo este animal apresentado dupla ovulação e esta gestação pode ser oriunda da ovulação do folículo que não foi inseminado. Estes autores acreditam que algum componente da célula espermática ou do plasma seminal inibe a ovulação ou a maturação normal do oócito equino, pois a inseminação artificial intrafolicular foi detrimental no estabelecimento de prenhez.

Devido não estar bem esclarecido o papel dos espermatozóides no insucesso da inseminação artificial intrafolicular, Parlevliet et al. (2004) desenvolveram um experimento com objetivo de avaliar a porcentagem de espermatozóides vivos e o estado acrossomal dos espermatozóides após a inseminação intrafolicular. Nove éguas receberam aplicação de hCG ou deslorelina e 36 horas após a indução da ovulação estas éguas foram inseminadas por inseminação intrafolicular com 50×10^6 (n=4) e 500×10^6 (n=5) espermatozóides móveis.

Quatro horas após a inseminação os folículos inseminados foram aspirados e observou-se a presença de espermatozóides móveis em 7 amostras, porém apenas 5 amostras apresentaram espermatozóides vivos. Todos os espermatozóides recuperados estavam com o acrossoma reagido. A taxa de recuperação de espermatozóides foi de 0,53% e 9,02% para as inseminações com 50×10^6 e 500×10^6 respectivamente. Com estes resultados os autores concluíram que o ambiente intrafolicular é desfavorável para a viabilidade espermática.

2.4. Líquido peritoneal

Durante a realização da inseminação intraperitoneal, os espermatozóides juntamente com o meio diluente e até mesmo bactérias são depositados na cavidade abdominal, bem como, após a inseminação intrafolicular, a cavidade peritoneal também tem contato com o sêmen, podendo este fato levar a um processo inflamatório nesta cavidade. A colheita de líquido peritoneal, através de abdominocentese para avaliação do mesmo, é um exame que pode ser associado com o histórico do animal para o diagnóstico de peritonite em eqüinos (DeHeer et al., 2002).

O líquido peritoneal normal representa um ultrafiltrado de plasma, tem um baixo volume, baixa celularidade e uma baixa concentração de proteína total, sua função é lubrificar a superfície dos órgãos e diminuir a fricção entre eles. Anormalidades no líquido peritoneal podem ser associadas a doenças que afetam os eqüinos como cólica, peritonite, injúria traumática e neoplasia (DeHeer et al., 2002).

O exame citológico do líquido peritoneal de um animal com dor abdominal pode ser crucial para um rápido diagnóstico diferencial, devido ao grande número de causas potenciais, auxiliando assim o início de uma terapia adequada (Connally, 2003).

A presença de sangue no líquido peritoneal pode ser conseqüência de uma contaminação no momento da colheita através de hemorragia superficial causada pela incisão na pele, devido à perfuração de músculos abdominais no momento em que a agulha ou cânula são introduzidas na cavidade abdominal, ou por perfuração de algum órgão abdominal. Entretanto, a presença de sangue no líquido peritoneal devido a uma hemorragia por diapedese causada por uma lesão na cavidade peritoneal ou hemoperitoneo, representam causas de uma efusão hemorrágica verdadeira. A diferenciação de contaminação ou hemorragia é de suma importância para uma correta interpretação dos resultados de uma análise de líquido peritoneal. Se no início da colheita o líquido peritoneal apresentar coloração clara e depois apresentar coloração avermelhada, indica que houve contaminação durante a

colheita, bem como quando acontece o contrário, sendo que no começo da colheita a amostra apresenta coloração avermelhada e depois começa a clarear. A quantidade de líquido peritoneal e a avaliação do tipo de células sangüíneas, podem auxiliar na diferenciação de hemorragia e contaminação (DeHeer et al., 2002).

Durante a abdominocentese também pode ocorrer contaminação com conteúdo intestinal em consequência da perfuração do intestino pela agulha ou cânula no momento da colheita, resultando em um líquido esverdeado ou até mesmo marrom (DeHeer et al., 2002). A frequência de contaminação com conteúdo intestinal durante a execução de uma abdominocentese é de 2 a 5%, mas normalmente não há graves consequências. Schumacher et al. (1985) desenvolveram um experimento com objetivo de determinar se a enterocentese acidental durante a paracentese pode interferir gravemente na interpretação de análises subseqüentes do líquido peritoneal e observaram uma leve peritonite quatro horas após a enterocentese.

A realização de abdominocenteses consecutivas em eqüinos normais causa pequenas alterações na composição do líquido peritoneal, podendo aumentar um pouco o número de células nucleadas e a concentração total de proteínas, mas sem exceder os valores normais (Schumacher et al., 1985). A contagem diferencial das células se mantém sem alteração, bem como a morfologia das células, podendo em alguns casos ser observada uma hipersegmentação dos neutrófilos e uma leve presença de leucofagocitose (DeHeer et al., 2002).

A análise do líquido peritoneal deve ser realizada o mais rápido possível, pois com o passar do tempo ocorre algumas alterações que mascaram o resultado do exame como por exemplo o aparecimento de macrófagos vacuolizados ou exibindo eritrofagia, crescimento bacteriano e as células nucleadas podem exibir alterações como hipersegmentação e picnose, o que é característico de processos crônicos (DeHeer et al., 2002).

Na análise visual do líquido peritoneal avalia-se volume, cor, turbidez e odor. O líquido peritoneal normal possui um pequeno volume (100 a 300 mL), é claro com uma pequena turbidez, apresenta cor amarelada e não possui odor (Brownlow et al., 1981).

Um aumento no volume do líquido peritoneal ocorre quando a taxa de formação deste líquido excede a taxa de remoção do mesmo. Em circunstâncias normais o líquido peritoneal é drenado por uma lacuna linfática especializada no diafragma, a qual conecta com o ducto linfático direito. O aumento no volume do líquido peritoneal pode ser causado tanto por transudação como por exudação. A transudação resultante de uma efusão ascítica apresenta baixa celularidade, baixa concentração de proteína e apresenta coloração de amarelo

a alaranjado, enquanto que na exsudação o líquido peritoneal apresenta alta celularidade e concentração de proteína, com um aspecto mais descolorido e turbido (DeHeer et al., 2002).

Durante a análise do líquido peritoneal deve ser realizado o exame citológico, fazendo-se a contagem total e diferencial das células nucleadas. Em geral, o número total de células nucleadas é menor que 5.000/ μ L no líquido peritoneal de equinos adultos saudáveis (Brownlow et al., 1981), sendo este número menor em potros (Grindem et al., 1990).

Na contagem diferencial das células nucleadas, elas são classificadas como neutrófilos, linfócitos, células mononucleadas grandes (monócitos, macrófagos e células mesoteliais), eosinófilos, basófilos e mastócitos. As células predominantes normalmente são os neutrófilos, seguidos pelas células mononucleares grandes e linfócitos. Os eosinófilos não são comuns e os basófilos e mastócitos raramente são observados (DeHeer et al., 2002).

Garma-Avinã (1998) observou que a classificação do fluido peritoneal em transudato, transudato modificado e exudato, baseado apenas na contagem total de células nucleadas e na concentração total de proteínas, pode levar a resultados ilusórios, sendo a contagem diferencial das células nucleadas mais eficiente na determinação do grau de inflamação, associada ou não com a avaliação da concentração de proteína.

Os neutrófilos são as mais comuns e importantes células do líquido peritoneal, agindo rápido e efetivamente na defesa celular primária após a invasão de microorganismos. Um aumento substancial no número de neutrófilos é indicativo de uma resposta inflamatória (Brownlow, 1983).

Bach & Ricketts (1985) analisaram o líquido peritoneal de 20 equinos adultos normais e observaram uma média de 3.300 (1.900-4.700) células nucleadas totais por μ L, sendo 64% de neutrófilos, 21% de linfócitos e 15 % de células nucleadas grandes. Entretanto, Schumacher et al. (1985) trabalharam com 25 equinos adultos saudáveis e observaram 4.600 (200-9.000) células nucleadas totais por μ L, 57% de neutrófilos, 15,5% de linfócitos, 26,5% de células mononucleares grandes e 1% de eosinófilos.

Analisando o líquido peritoneal de 17 potros saudáveis entre 13 e 134 dias, Grindem et al. (1990) constataram que a comparação dos resultados obtidos de potros com os valores referentes de equinos adultos saudáveis tem validade questionável, considerando que os valores referentes de potros saudáveis são diferentes dos valores referentes a equinos adultos saudáveis, sendo a maior diferença encontrada na contagem total de células nucleadas, que em animais adultos é considerada normal de 5 a 10×10^9 /L e o maior valor encontrado neste experimento foi de $1,5 \times 10^9$ /L.

Durante a realização do exame citológico do líquido peritoneal é importante que se avalie a morfologia das células, pois esta avaliação sugere a idade das células, a atividade, demonstra as condições ambientais da cavidade peritoneal, além de auxiliar em diagnósticos diferenciais, na avaliação à resposta a algum tratamento e também na determinação do prognóstico (DeHeer et al., 2002).

Os neutrófilos que caem na cavidade peritoneal não retornam para corrente sanguínea, envelhecendo e morrendo na cavidade peritoneal. Os neutrófilos velhos são moderadamente hipersegmentados e picnóticos. A leucofagocitose de neutrófilos velhos, por macrófagos, pode ser observada no líquido peritoneal de animais saudáveis, porém no líquido peritoneal normal os neutrófilos não apresentam atividade fagocítica (Brownlow et al., 1981).

Brownlow (1983) observou que em líquido peritoneal normal, sem inflamação, os neutrófilos apresentam membrana nuclear distinta, cromatina condensada e o núcleo um pouco mais segmentado, com uma aparência semelhante aos neutrófilos encontrados no sangue. Entretanto, em exudato peritoneal de animais com processo inflamatório o número destas células aumentam significativamente, podendo apresentar fragmentação do núcleo e em processos inflamatórios mais graves observou-se a presença de neutrófilos lisados e até mesmo degenerados, com vacúolos e debris no citoplasma.

A presença de amontoados de neutrófilos ou células granulocíticas imaturas, sugerem inflamação aguda associada a um prognóstico reservado (Garma-Aviña, 1998) e a presença de alterações degenerativas como inchaço celular, perda da segmentação nuclear e margem nuclear não distinta indicam uma irritação no ambiente peritoneal, podendo ser consequência de citocinas bacterianas ou substâncias irritantes como bile ou urina. Alterações tóxicas como aumento na basofilia citoplasmática e vacuolização, podem ser observadas em septicemia e enterotoxemia (DeHeer et al., 2002).

As células mononucleares grandes envolvem os monócitos, macrófagos e células mesoteliais e são também referidas como fagócitos mononucleares. Estas células são grandes com núcleos abundantes e na maioria das vezes com citoplasma basófilo (Brownlow et al., 1981).

As células mesoteliais ocorrem em maiores proporções em baixa celularidade e em alto volume de transudato. Em efusão exudativa estas células começam a apresentar-se reativas com aumento na basofilia do citoplasma, multinucleação e atividade mitótica (DeHeer et al., 2002).

Em casos de inflamação aguda a porcentagem relativa de monócitos e macrófagos diminuem e ocorre um aumento na porcentagem de neutrófilos. Entretanto, em efusões

crônicas ocorre um aumento na porcentagem de macrófagos apresentando alterações reativas (DeHeer et al., 2002).

No líquido peritoneal normal os linfócitos são pequenos e aparecem em pequena porcentagem. Um aumento na porcentagem de linfócitos pode ocorrer em condições inflamatórias crônicas (Brownlow et al., 1981).

Um aumento na porcentagem de eosinófilos normalmente está associado com um aumento na porcentagem de basófilos e mastócitos e pode estar correlacionado com parasitismo intestinal e também a outras causas inflamatórias como neoplasias (Bach & Ricketts, 1985).

Na análise bioquímica do líquido peritoneal avalia-se a concentração de proteína total, densidade, concentração de fibrinogênio e pH. Em geral a concentração total de proteínas no líquido peritoneal normal é menor que 2,5 g/dL. Schumacher et al. (1985) ao analisarem o líquido peritoneal de 20 equinos adultos saudáveis observaram 1,75 (0,1-3,4) g/dL de proteína total. Entretanto, Behrens et al. (1990) obtiveram uma concentração total de proteínas de 1,8 g/dL no líquido peritoneal de 32 potros saudáveis.

A densidade do líquido peritoneal é a reflexão da quantidade de solutos diluídos no líquido, e os valores da densidade podem variar de 1000 a 1093 do líquido peritoneal de equinos adultos saudáveis (Schumacher et al., 1985). Brownlow et al. (1981) obtiveram uma densidade média de 1010 do líquido peritoneal de 20 equinos adultos saudáveis. O líquido peritoneal normal possui pequenas quantidades de fibrinogênio, em concentrações menores que 100mg/dL (Brownlow et al., 1981). A concentração de glicose no líquido peritoneal de equinos saudáveis é semelhante ou um pouco maior do que a concentração sérica sendo de 40 a 50 mg/dL (DeHeer et al., 2002).

Behrens et al. (1990) avaliaram o líquido peritoneal de 32 potros com objetivo de determinar os valores referentes ao líquido peritoneal de potros saudáveis, entre 14 e 75 dias e observaram que a cor do líquido peritoneal é amarelo claro, o número total de células nucleadas foi de 1418/ μ L, sendo 15,3% de neutrófilos, 43,8% de células mononucleares grandes (macrófagos e células mesoteliais) e 22,3% de linfócitos. A concentração de glicose foi de 136,9 mg/dL e de fibrinogênio <200-400 mg/dL. Entretanto, Brownlow et al. (1981) trabalhando com líquido peritoneal de equinos adultos saudáveis, observaram $4,33 \times 10^9$ células nucleadas, sendo 45,2% de leucócitos, 47% de fagócitos mononucleares, 7,8% de linfócitos e 0,7% de eosinófilos. Neste mesmo trabalho observaram uma concentração total de proteínas de 7,7 g/L e pH de 7,0.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. EXPERIMENTO 1 - Avaliação da viabilidade do sêmen congelado de garanhões, quando diluído em fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de éguas.

Amostras de sêmen congelado (n=20), provenientes de dois ejaculados de 10 garanhões, foram avaliadas após a descongelação, sem serem diluídas (Grupo I - GI), diluídas em meio Kenney (Grupo II - GII) e diluídas em fluido folicular (Grupo III - GIII). As avaliações foram realizadas logo após a descongelação ou diluição (T0), bem como após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas, sendo estas amostras mantidas em temperatura ambiente. As diluições das amostras de GII e GIII foram realizadas lentamente na proporção de volume 1:1 (0,5 mL de sêmen : 0,5 mL de diluidor).

Para recuperação do fluido folicular realizou-se punção folicular em uma égua, 36 horas após aplicação endovenosa de 2500 UI de hCG (Vetecor[®], Laboratório Calier, São Paulo, SP), a qual foi realizada quando o folículo dominante apresentava 35 mm de diâmetro. A égua foi sedada com a aplicação de 0,08 mg/Kg de Romifidina (Sedivet[®], Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemanha) e contida em tronco. Para a aspiração do folículo pré ovulatório foi utilizado um ultra-som modelo Scanner 200 Vet-Pie-Medical Ltda (Holanda) com probe setorial de 7,5 Mhz multi-angular (150°/90°/60°) acoplada a um sistema para ultrasonografia trans-vaginal munido de uma agulha descartável. Através de manipulação retal, o ovário foi posicionado de maneira que o folículo a ser puncionado ficasse na posição da linha de punção no monitor do ultra-som. A aspiração do fluido folicular foi realizada manualmente com auxílio de seringa descartável. O fluido folicular foi centrifugado a 300g durante 15 minutos, separado em aliquotas de 1,0 mL e então congelado.

3.1.1. Avaliações do movimento espermático

Avaliou-se a motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MP - %), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea (VSL - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), espermatozóides com movimento rápido (RAP - %; VAP > 70 $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm), frequência de batimentos flagelares (BCF - Hz) e índice retilíneo (STR - %) utilizando

análise computadorizada (CASA), realizada no sistema Hamilton Thorn Research (HTMA-IVOS-10), nos momentos T0, T1, T2 e T3 em todos os grupos.

3.1.2. Avaliação de integridade da membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática (IMP - %) dos espermatozóides dos grupos GI, GII e GIII foi avaliada no momento T0, através de coloração fluorescente utilizando diacetato de carboxifluoresceína (C 5041-Sigma) e iodeto de propídio (P 4170-Sigma), realizada de acordo com a técnica descrita por Zúccari (1998), onde uma alíquota 10 µL da amostra de sêmen foi diluída em 40 µL de solução de trabalho. A solução de trabalho foi preparada com 0,96 mL de citrato de sódio 3%, 10 µL de formalina (1 parte de formalina 40% para 79 partes de solução fisiológica), 10 µL de iodeto de propídeo (10 mg de iodeto de propídeo e 20 ml de dimetilsulfóxido) e 20 µl de carboxifluoresceína (9,2 mg de diacetato de carboxifluoresceína e 20 ml de dimetilsulfóxido). As amostras foram analisadas entre lâminas e lamínulas em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x com óleo de imersão. Foram contados 200 espermatozóides de cada amostra, sendo considerados com membrana íntegra aqueles corados em verde e lesada aqueles corados em vermelho ou verde e vermelho.

3.1.3. Avaliação da reação acrossomal

Verificou-se a reação acrossomal das amostras no momento T1, através de sondas fluorescentes, utilizando FITC-PNA (Conjugado de Lecitina de *Arachis Hypogaea* L7381-Sigma) e iodeto de propídio. A preparação da solução de trabalho para esta avaliação é semelhante à solução utilizada para avaliação da integridade da membrana plasmática, citada anteriormente, sendo que para análise da integridade acrossomal faz-se a substituição da carboxifluoresceína por 20 µl de FITC-PNA (Ponchirolli et al., 2002). A avaliação foi realizada com auxílio do mesmo equipamento das análises de integridade de membrana plasmática, descrita anteriormente. Os espermatozóides foram classificados como mortos com acrossoma não reagido quando corados com o iodeto de propídeo (todo vermelho), mortos com acrossoma reagido quando corados pelo FITC-PNA (verde) na região acrossomal e pelo iodeto de propídeo (vermelho), vivos com acrossoma não reagido quando não apresentavam nenhum padrão de coloração, sendo avaliados sem a luz fluorescente e vivos com acrossoma

reagido quando apresentavam somente a região apical do acrossoma corado pelo FITC-PNA (verde).

3.1.4. Análise estatística

Para as variáveis integridade de membrana plasmática, porcentagem de espermatozóides mortos com membrana acrossomal íntegra, porcentagem de espermatozóides mortos com membrana acrossomal reagida e porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra, que apresentaram distribuição normal nos resíduos e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas na comparação dos grupos, já que os mesmas partidas de sêmen congelado foram utilizadas em cada grupo. Para as demais variáveis, que também apresentaram distribuição normal nos resíduos e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas na comparação dos grupos em cada momento e nos momentos em cada grupo. O nível de significância utilizado foi de 5% (Siegel, 1990).

3.2. EXPERIMENTO 2 – Avaliação da população espermática no oviduto de éguas após a inseminação artificial, utilizando diferentes técnicas de inseminação com sêmen fresco e congelado de garanhões.

Foi quantificado o número de espermatozóides no oviduto das éguas após as mesmas serem inseminadas através das seguintes técnicas, deposição do sêmen no corpo do útero (IACU), deposição do sêmen na extremidade do corno uterino (IAPC), inseminação histeroscópica (IAH) e inseminação intraperitoneal (IAIP). Este experimento foi realizado em abril de 2004, no frigorífico de equinos Miramar, localizado na cidade de Pelotas-RS, sendo utilizadas 57 éguas.

No dia anterior ao abate as éguas passavam por uma avaliação ginecológica (palpação retal), e então os animais em anestro eram selecionados para posteriormente serem inseminados.

Após as éguas serem abatidas, os úteros eram recuperados e identificados no momento da retirada das vísceras, na linha de abate. As peças eram levadas para uma sala onde os ovidutos eram dissecados e lavados para recuperação dos espermatozóides. Para as inseminações IAH, IAPC e IAIP apenas o oviduto ipsilateral à inseminação era dissecado e lavado e para as inseminações IACU ambos os ovidutos foram avaliados. Para a lavagem dos

ovidutos foram utilizados 3,0 mL de Ringer com Lactato de sódio. Através da fímbria introduzia-se uma agulha 40x12 e prendia-se a mesma com uma pinça hemostática protegida com borracha, para evitar o retorno de líquido, então era acoplada a esta agulha uma seringa contendo 3,0 mL de ringer lactato . O líquido era recuperado em um tubo de centrifuga de 15 mL graduado, para avaliação do volume recuperado (Figura 1 – técnica utilizada para a lavagem dos ovidutos).

O volume recuperado foi centrifugado e ressuspenso em 0,5 mL de Ringer com Lactato de Sódio. A concentração foi determinada através de câmara hematimétrica (Neubauer).

Para análise estatística foi utilizado o Teste Exato de Fisher para comparar o número dos ovidutos em que foram encontrados espermatozoides entre os grupos e ANOVA para comparar as médias de espermatozoides encontrados por oviduto entre os grupos.

Figura 1. Técnica utilizada para lavagem dos ovidutos



A



B



C



D



E

A. Ponta do corno, oviduto e ovário; B. Oviduto após dissecação; C. Material utilizado para lavagem do oviduto; D. Oviduto com agulha e seringa contendo Ringer com Lactato posicionada na fímbria e com a papila dentro de um tubo de centrífuga graduado (15 mL); E. Oviduto repleto de Ringer com Lactato.

3.2.1. Parte I – Avaliação da população de espermatozóides no oviduto de éguas inseminadas com diferentes técnicas de inseminação, com sêmen congelado do garanhão A.

As inseminações foram realizadas com sêmen congelado do garanhão A, o mesmo garanhão utilizado na realização do teste de fertilidade deste trabalho (Experimento 3), em que as partidas de sêmen utilizadas apresentavam média de motilidade total de 63,4%. O sêmen armazenado em palhetas de 0,5 mL foi descongelado a 46°C por 20 segundos. Doze horas antes do abate, dezessete éguas foram inseminadas aleatoriamente nos seguintes grupos:

GIA – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IACU (n=4)

GIB – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IAPC (n=5)

GIC – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IAH (n=4)

GID – 500×10^6 espermatozóides móveis – 4,0 mL - IACU (n=4)

3.2.2. Parte II – Avaliação da população de espermatozóides no oviduto de éguas inseminadas com diferentes técnicas de inseminação, com sêmen fresco e congelado do garanhão B

Para as inseminações realizadas com sêmen fresco, foi realizada uma colheita de sêmen do garanhão B, avaliou-se a motilidade total e a concentração de espermatozóides do sêmen e então foram realizadas diferentes diluições utilizando o meio Max-Semen Plus (EHG Agrofarma, Mogi-Mirim-SP, Brasil), de acordo com a concentração e o volume desejado para a realização das inseminações. O sêmen era acondicionado na caixa para transporte de sêmen Max Sêmen Express (EHG Agrofarma, Mogi-Mirim-SP, Brasil) e transportado até o frigorífico onde eram realizadas as inseminações. O tempo entre a colheita do sêmen e as inseminações foi de aproximadamente quatro horas.

Doze horas antes do abate 24 éguas foram inseminadas aleatoriamente nos seguintes grupos:

GIIA – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IACU (n=5)

GIIB – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IAPC (n=5)

GIIC – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IAH (n=4)

GIID – 500×10^6 espermatozóides móveis – 10,0 mL - IACU (n=5)

GIIE – 100×10^6 espermatozóides móveis – 2,0 mL - IAIP (n=5)

Foram congelados dois ejaculados do garanhão B para a realização das inseminações e as partidas de sêmen utilizadas apresentavam média de motilidade total de 70,5%. O protocolo de congelação foi o mesmo utilizado para congelação do sêmen do garanhão A, o qual foi utilizado na parte I deste experimento e no experimento 3 deste trabalho (teste de fertilidade). O sêmen armazenado em palhetas de 0,5 mL foi descongelado a 46°C por 20 segundos. Doze horas antes do abate, 16 éguas foram inseminadas aleatoriamente nos seguintes grupos:

GIIIA – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IACU (n=4)

GIIIIB – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IAPC (n=4)

GIIIIC – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL - IAH (n=4)

GIIIID – 500×10^6 espermatozóides móveis – 4,0 mL - IACU (n=4)

3.2.3. Metodologia utilizada para realização das inseminações da Parte I e II do experimento 2

3.2.3.1. Inseminação convencional

O sêmen foi depositado no corpo do útero, através de pipeta flexível (Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre-RS, Brasil), onde uma palheta de sêmen (0,5 mL) era introduzida na pipeta e com auxílio de um mandril o sêmen era inoculado no corpo do útero.

3.2.3.2. Inseminação na extremidade do corno uterino

O sêmen foi depositado na extremidade do corno uterino através do desvio pipeta flexível, sendo a mesma utilizada para realização da inseminação convencional, por manipulação retal.

3.2.3.3. Inseminação histeroscópica

Previamente as inseminações por endoscopia, o sêmen foi aspirado para o interior de um tubo de polietileno, presente no canal de trabalho do aparelho de endoscopia. Um colonoscópio flexível (Olympus) acoplado a um compressor e fonte de luz de halogênio de 150 watts era introduzido no útero. O lúmen uterino era inflado com uma quantidade de ar suficiente para visualização da região da bifurcação e o endoscópio direcionado para a região dapapila tubárica desejada e quando localizada a papila, o sêmen era depositado sobre a mesma. Antes de retirar o endoscópio do lúmen uterino o ar era aspirado.

3.2.3.4. Inseminação intraperitoneal

Para a inseminação foi utilizado um ultra-som modelo Scanner 200 Vet-Pie-Medical com probe setorial de 7,5 Mhz multi-angular (150°/90°/60°) acoplada a um sistema para ultra-sonografia trans-vaginal munido de uma agulha descartável. Foi utilizado um angulo de rastreamento de 90 graus, pois seu campo ultra-sonográfico facilita o posicionamento do ovário sob linha de punção.

O transdutor era introduzido gentilmente na vagina, sendo posicionado à direita ou à esquerda do orifício externo da cérvix de acordo com o ovário a ser inseminado. Através de manipulação retal, o ovário era então posicionado até que o mesmo aparecesse sob a linha de punção no monitor do ultra-som e então o fundo da vagina era perfurado e o sêmen era depositado sobre o ovário com auxílio de seringas descartáveis.

3.2.4. Parte III – Avaliação da recuperação espermática após inseminações artificiais intrafoliculares (IAIF), *in vitro*, com sêmen congelado do garanhão A.

Foram coletados seis ovários que possuíam folículos de 35 a 40 mm de diâmetro, na linha de abate do frigorífico Miramar. Os ovários foram levados até um laboratório e os folículos foram inseminados com 20×10^6 espermatozóides móveis oriundos do sêmen congelado do garanhão utilizado na parte I deste experimento, com auxílio de seringa de insulina (1,0 mL) e agulha descartável 30x8. O sêmen foi descongelado a 46°C por 20

segundos. Estes ovários foram mantidos por 3 horas em temperatura ambiente e então foram aspirados através de seringa de 20 mL e agulha 30x8, para avaliar a taxa de recuperação espermática, com objetivo de verificar se os espermatozóides se mantêm livres no fluido folicular após a IAIF. O número de espermatozóides recuperados do fluido folicular foi determinado através da análise do volume de fluido recuperado e a concentração espermática deste fluido, que foi determinada através da câmara de Neubauer.

Esta parte do experimento foi realizada *in vitro*, devido ao baixo resultado de fertilidade obtido com a aplicação desta técnica *in vivo*.

3.3. EXPERIMENTO 3 – Teste de fertilidade entre diferentes técnicas de inseminação artificial utilizando um baixo número de espermatozóides.

Foram realizadas inseminações convencional (IACU), na extremidade do corno uterino (IAPC), histeroscópica (IAH), intrafolicular (IAIF) e intraperitoneal (IAIP), para verificar a eficiência de cada uma destas técnicas, utilizando um baixo número de espermatozóides, provenientes de sêmen congelado (IACU, IAPC, IAH e IAIF) e fresco (IAIP) do garanhão A. Foram utilizadas 20 éguas em atividade reprodutiva, de diferentes padrões raciais, com idade variando entre 5 e 12 anos de idade, pesando entre 350 e 500 Kg, de propriedade da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, SP.

Os animais eram submetidos à palpação retal bem como avaliação ultrasonográfica 3 vezes por semana para detecção do estro e após este momento, as avaliações eram diárias. Quando o folículo pré ovulatório atingia 35 mm de diâmetro, os animais recebiam uma aplicação endovenosa de 2500 UI de hCG (Vetecor, Callier São Paulo-SP, Brasil) ou 1,0 mg de deslorelina (Bet Laboratories, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e então as avaliações ultra-sonográficas eram realizadas a cada 6 horas após 30 horas da indução da ovulação. As inseminações IACU, IAPC e IAH eram realizadas logo após a detecção da ovulação e as inseminações IAIF e IAIP eram realizadas assim que as imagens do ultra-som e a flutuação do folículo demonstravam proximidade da ovulação e nestes dois grupos a confirmação da ovulação era realizada depois de seis horas das inseminações. Neste experimento foram utilizadas cinco partidas de sêmen congelado do garanhão A, que apresentavam em média motilidade total de 63,4%.

O diagnóstico de gestação era realizado 14 dias após as ovulações, por ultrasonografia e então era aplicado 5mg de protaglandina F₂α (Lutalyse, Pharmacia Brasil Ltda., Paulínia-SP, Brasil), intramuscular, para que os animais pudessem ser utilizados em outro grupo experimental. Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Cochran (Siegel, 1975).

As éguas foram inseminadas aleatoriamente em todos os seguintes grupos:

GRUPO I (n=20): 20x10⁶ espermatozóides móveis - IACU - 0,5 mL – sêmen congelado

GRUPO II (n=20): 20x10⁶ espermatozóides móveis - IAPC - 0,5 mL – sêmen congelado

GRUPO III (n=20): 20x10⁶ espermatozóides móveis - IAH - 0,5 mL – sêmen congelado

GRUPO IV (n=20): 20x10⁶ espermatozóides móveis - IAIF - 0,5 mL – sêmen congelado

GRUPO V (n=20): 100x10⁶ espermatozóides móveis - IAIP - 2,0 mL – sêmen fresco

3.3.1. Metodologia para execução das inseminações do experimento 3

3.3.1.1. Inseminação convencional (IACU)

Uma palheta de sêmen (0,5 mL) era descongelado a 46°C por 20 segundos e a técnica de inseminação utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.1.

3.3.1.2. Inseminação na extremidade do corno uterino (IAPC)

Uma palheta de sêmen (0,5 mL) era descongelada a 46°C por 20 segundos e a técnica de inseminação utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.2.

3.3.1.3. Inseminação histeroscópica (IAH)

Uma palheta de sêmen era descongelada a 46°C por 20 segundos. As éguas eram sedadas com a aplicação de 0,08 mg/Kg de Romifidina (Sedivet, Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemanha), sendo que a técnica de inseminação utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.3.

3.3.1.4. Inseminação intraperitoneal (IAIP)

Neste grupo foi utilizado sêmen fresco do mesmo garanhão utilizado nos demais grupos. Após a colheita do sêmen o mesmo era diluído 1:1 com o meio Emlcare Embryo Holding Solution[®] (ICP bio, Auckland, Nova Zelândia) e então centrifugado por 10 minutos a uma força de 600g. Após a centrifugação o sêmen era ressuspenso com meio Emlcare Embryo Holding Solution[®] para uma concentração de 50×10^6 espermatozóides móveis por mL.

As inseminações foram realizadas quando detectado a proximidade da ovulação por palpação retal (flutuação do folículo e reflexo de dor no momento da palpação) e avaliação ultra-sonográfica (folículo com parede dupla e perdendo a forma). As éguas eram sedadas com a aplicação de 0,08 mg/Kg de Romifidina (Sedivet, Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemanha) e contidas em tronco. A técnica de inseminação utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.3.4.

3.3.1.5. Inseminação intrafolicular (IAIF)

Uma palheta de sêmen contendo 20×10^6 espermatozóides móveis era descongelada a 46°C por 20 segundos. As inseminações foram realizadas quando detectado a proximidade da ovulação por palpação retal e avaliação ultra-sonográfica, em intervalos de tempo inferiores a 3 horas pré-ovulação, pois em uma fase pré-experimental observamos uma alta formação de folículos luteinizados, quando realizávamos as inseminações intrafoliculares em um intervalo de tempo maior que doze horas pré-ovulação (24 horas após hCG). As éguas serão sedadas com a aplicação de 0,08 mg/Kg de Romifidina (Sedivet[®], Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemanha) e contidas em tronco. Para a inseminação do folículo pré-ovulatório foi utilizado um ultra-som modelo Scanner 200 Vet-Pie-Medical Lta (Holanda) com probe setorial de 7,5 Mhz multi-angular (150°/90°/60°) acoplada a um sistema para ultra-sonografia trans-vaginal munido de uma agulha descartável. Foi utilizado um ângulo de rastreamento de 90 graus, pois seu campo ultra-sonográfico facilita o posicionamento do folículo na linha de punção.

O transdutor era introduzido gentilmente na vagina, sendo posicionado à direita ou à esquerda do orifício externo da cervix de acordo com o ovário que contém o folículo pré-ovulatório. Através de manipulação retal, os ovários eram então posicionados até que o folículo a ser inseminado aparecesse na linha de punção no monitor do ultra-som e então o sêmen era depositado dentro do folículo com auxílio de seringas descartáveis.

3.4. EXPERIMENTO 4 – Avaliação da reação inflamatória causada na cavidade peritoneal, após as inseminações intrafoliculares e intraperitoneais

O fluido peritoneal foi avaliado antes das inseminações (T0) e 6 horas (T6) após as inseminações intrafoliculares (n=14 éguas) e intraperitoneais (n=15 éguas) realizadas no experimento 3, para verificar a reação inflamatória na cavidade peritoneal causada por estas técnicas. Também foram colhidas amostras de fluido peritoneal de 7 éguas que não foram inseminadas, sendo o momento da primeira colheita considerado T0 e o momento da segunda colheita, a qual foi realizada 6 horas após a primeira, considerada T6. Das 7 éguas não inseminadas utilizadas, 4 não ovularam entre T0 e T6 (grupo controle: GC) e 3 éguas ovularam entre T0 e T6 (grupo controle ovulação: GCO). As amostras do fluido peritoneal foram colhidas utilizando paracentese no ponto mais baixo do abdome ventral, sobre a linha média, com agulha 40x12. Antes de punção a área era tricotomizada e tratada com álcool iodado a 5%.

As amostras eram divididas em dois frascos, sendo um sem e outro contendo EDTA (5 mg) e então encaminhadas para o Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/ Botucatu-SP, onde avaliou-se os seguintes parâmetros:

- Cor, por avaliação visual;
- Aspecto, por avaliação visual;
- PH e sangue oculto, através de fita para exame químico (Combur 10 test M, Roche, Mannheim, Alemanha).
- Densidade, através de refratômetro
- Concentração de proteínas, através de refratômetro
- Concentração de glicose, através de refratômetro
- Fibrinogênio, por precipitação pelo calor
- Coagulação, por avaliação visual no tubo em que não continha EDTA
- Contagem total de hemácias e células nucleadas, em câmara de Neubauer;
- Contagem diferencial e exame citológico das células nucleadas, em esfregaços corados em Panótico.

A análise estatística para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi utilizado o Teste T de Student para populações dependentes ou independentes, caso contrário, foi utilizado o Wilcoxon para populações dependentes e o Mann-Whitney para populações independentes. O nível de significância utilizado foi de 5% (Siegel, 1975).

3.5. EXPERIMENTO 5 – Efeito da deposição do sêmen congelado no folículo pré-ovulatório, sobre os índices de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco pelo método convencional.

Neste experimento realizamos a IAIF, com 20×10^6 espermatozóides móveis oriundos do sêmen congelado do garanhão A, utilizado no experimento 3, concomitantemente com a inseminação convencional (IACU) com 500×10^6 espermatozóides móveis oriundos do sêmen fresco de um jumento, com o objetivo de verificar se a presença dos espermatozóides no folículo, poderia prejudicar a viabilidade e ou a maturação do oócito. A técnica utilizada para a realização das inseminações IAIF foi a mesma técnica descrita no experimento 3 e no grupo em que as éguas foram inseminadas apenas com o sêmen do jumento, as éguas eram inseminadas pelo método convencional a partir do momento em que o folículo atingia 35 mm de diâmetro, a cada 48 horas até a detecção da ovulação.

O diagnóstico de gestação era realizado 14 dias após as ovulações, por ultrassonografia e então era aplicado 5mg de protaglandina $F_{2\alpha}$ (Lutalyse, Pharmacia Brasil Ltda., Paulínia-SP, Brasil), intramuscular, para que os animais pudessem ser utilizados em outros grupos experimentais. Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Goodman (Morrison, 1990).

As éguas foram inseminadas de acordo com os seguintes grupos:

- GA (n=10) – 20×10^6 espermatozóides móveis – IAIF – 0,5 mL – sêmen congelado (garanhão)
500x10⁶ espermatozóides móveis – IACU – 15 mL – sêmen fresco de jumento
GB (n=18) – 500×10^6 espermatozóides móveis – IACU – 15 mL – sêmen fresco de jumento

4. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 - Avaliação da viabilidade do sêmen congelado de garanhões, quando diluído em fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de éguas.

A porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra logo após a diluição ou descongelação (T0) não foi estatisticamente diferente ($p>0,05$) entre os grupos (Tabela 1). Não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos, na porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra, uma hora após a diluição ou descongelação (T1). Também não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) na porcentagem de espermatozóides mortos com membrana acrossomal íntegra e espermatozóides mortos com membrana acrossomal reagida (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão referentes à variável porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (IMP) logo após a descongelação ou diluição (T0) e às variáveis porcentagem de espermatozóides mortos com a membrana acrossomal íntegra (MI), porcentagem de espermatozóides mortos com acrossoma reagido (MR) e porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra (VI) uma hora após a descongelação ou diluição (T1), segundo os grupos I, II e III.

Variável	Grupo			Valor de p
	GI	GII	GIII	
IMP	46,6 ± 7,4	46,9 ± 7,0	46,0 ± 7,6	0,68
MI	44,6 ± 9,2	42,3 ± 8,4	43,4 ± 7,7	0,40
MR	21,1 ± 7,4	21,8 ± 7,8	26,4 ± 4,3	0,16
VI	33,7 ± 10,8	35,5 ± 10,8	29,5 ± 9,5	0,16

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5% (quando $p>0,05$ os grupos não diferem estatisticamente).

O efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de motilidade total do sêmen está apresentado na tabela 2, onde observa-se que apenas no momento T0 a motilidade total foi significativamente inferior ($p<0,05$) no GIII. Entretanto após 1, 2 e 3 horas esta motilidade

foi igual entre os demais grupos ($p>0,05$). Com o passar do tempo a motilidade total diminuiu significativamente ($p<0,05$) em todos os grupos.

Tabela 2. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de motilidade total (MT) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	II	GIII
T0	58,9 ± 7,9 Aa	59,4 ± 11,0 Aa	53,7 ± 10,0 Ab
T1	52,3 ± 9,9 Aa	53,2 ± 8,2 Aa	47,7 ± 8,9 Aa
T2	43,9 ± 10,1 Ba	46,1 ± 10,0 Ba	36,4 ± 11,8 Ba
T3	35,3 ± 13,8 Ba	40,5 ± 11,9 Ba	30,2 ± 10,6 Ba

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(2) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

Na tabela 3 observa-se que a porcentagem de motilidade progressiva foi significativamente maior ($p<0,05$) em GII do que nos demais grupos no momento T0, fato este que se repetiu no momento T3. A motilidade progressiva, diminuiu de forma significativa ($p<0,05$) com o passar do tempo, em todos os grupos.

Tabela 3. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de motilidade progressiva (MP) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	GII	GIII
T0	19,1 ± 5,7 Ab	23,7 ± 7,2 Aa	19,4 ± 4,1 Ab
T1	13,7 ± 4,3 Ab	19,0 ± 7,2 Ba	15,6 ± 5,4 Aab
T2	10,2 ± 4,7 Ba	13,6 ± 6,4 Ca	9,6 ± 4,3 Ba
T3	7,6 ± 4,5 Bb	11,3 ± 5,6 Ca	7,4 ± 3,8 Bb

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(2) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

A velocidade espermática ao longo de uma trajetória (VAP) foi significativamente maior em GIII quando comparado com GI ($p < 0,05$) nos momentos T0, T1 e T2. Entretanto, não foi maior que GII, grupo este que também não se diferiu ($p > 0,05$) de GI nos momentos T0, T1 e T2. Em T3, as diferenças desapareceram e os valores de VAP dos grupos foram iguais ($p > 0,05$). Com o decorrer do tempo os valores de VAP de todos os grupos foram diminuindo ($p < 0,05$) significativamente (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão referentes à velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP - $\mu\text{m/s}$) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	II	GIII
T0	93,0 \pm 7,7 Ab	92,7 \pm 8,8 Aab	98,8 \pm 4,4 Aa
T1	87,7 \pm 8,9 Ab	93,9 \pm 9,9 Aab	97,8 \pm 6,2 Aa
T2	81,7 \pm 11,7 BCb	88,4 \pm 14,9 ABab	91,6 \pm 9,1 ABa
T3	73,5 \pm 17,3 Ca	84,3 \pm 19,0 Ba	86,0 \pm 18,8 Ba

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(2) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

A velocidade espermática considerando uma trajetória retilínea (VSL) foi significativamente menor ($p < 0,05$) em GI nos momentos T0 e T1, no momento T2 esta diferença desapareceu em relação a GII ($p > 0,05$), mas manteve-se em relação a GIII ($P < 0,05$) e no momento T3, não observou-se diferença ($p > 0,05$) entre os grupos. Com o passar do tempo observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) dos valores de VSL em todos os grupos (tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão referentes à velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea (VSL - $\mu\text{m/s}$) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	II	GIII
T0	68,3 \pm 6,1 Ab	74,5 \pm 8,1 Aa	73,0 \pm 3,9 Aa
T1	63,3 \pm 6,5 Ab	69,9 \pm 9,5 Aba	70,3 \pm 5,9 Aa
T2	58,8 \pm 8,5 Bb	64,5 \pm 10,6 Bcab	65,4 \pm 6,7 Aa
T3	52,7 \pm 12,3 Ba	59,9 \pm 13,6 Ca	60,8 \pm 13,2 Ba

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(2) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

A velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL) foi significativamente menor ($p < 0,05$) em GI nos momentos T0 e T1. No momento T2 esta diferença manteve-se somente em relação a GIII ($p < 0,05$) e em T3, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). O VCL se manteve em GII e GIII com o passar do tempo, mas reduziu significativamente ($p < 0,05$) em GI no momento T3 (Tabela 6).

Tabela 6. Média e desvio padrão referentes à velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL - $\mu\text{m/s}$) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	II	GIII
T0	171,0 \pm 16,6 Ab	179,9 \pm 16,8 Aa	184,2 \pm 11,3 Aa
T1	164,9 \pm 19,0 Ab	178,0 \pm 16,1 Aa	184,3 \pm 13,5 Aa
T2	156,6 \pm 21,7 ABb	170,2 \pm 26,7 Aab	176,6 \pm 18,2 Aa
T3	142,3 \pm 33,7 Ba	164,6 \pm 36,2 Aa	166,7 \pm 37,1 Aa

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(2) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

O deslocamento lateral da cabeça (ALH) foi significativamente menor ($p < 0,05$) em GII apenas no momento T0. Entretanto, nos demais momentos não foi observado diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no ALH entre os momentos em GI, GII e GIII (Tabela 7).

Tabela 7. Média e desvio padrão referentes ao deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	II	GIII
T0	7,9 \pm 0,7 a	7,0 \pm 0,8 b	7,3 \pm 0,8 a
T1	7,4 \pm 0,7 a	7,3 \pm 0,7 a	7,5 \pm 0,7 a
T2	7,4 \pm 0,8 a	7,2 \pm 0,7 a	7,6 \pm 0,8 a
T3	6,7 \pm 1,5 a	7,0 \pm 1,2 a	7,0 \pm 1,4 a

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(*) Não houve diferença estatisticamente significativa entre momentos em cada grupo ($p > 0,05$)

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

Na tabela 8 observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na frequência de batimentos flagelares (BCF) entre os momentos em GI, GII e GIII. O valor da BCF foi significativamente menor ($p < 0,05$) em GI nos momentos T0, T1 e T2. Entretanto, no momento T3 não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 8. Média e desvio padrão referentes à frequência dos batimentos flagelares (BCF - Hz) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	II	GIII
T0	27,8 ± 4,2 b	32,6 ± 5,0 a	31,6 ± 4,1 a
T1	26,5 ± 3,0 b	31,8 ± 3,9 a	31,3 ± 3,8 a
T2	26,4 ± 3,1 b	30,8 ± 3,9 a	31,2 ± 4,0 a
T3	24,8 ± 6,6 a	28,7 ± 6,3 a	29,7 ± 6,6 a

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(*) Não houve diferença estatisticamente significativa entre momentos em cada grupo (p>0,05)

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

O índice de movimento retilíneo (STR) foi significativamente maior (p<0,05) em GII nos momentos T0 e T1 e nos momentos T2 e T3, não foi observado diferença (p>0,05) entre os grupos. Não houve diferença (p>0,05) de STR entre momentos em cada grupo (Tabela 9).

Tabela 9. Média e desvio padrão referentes ao índice retilíneo (STR - %) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	GII	GIII
T0	73,5 ± 4,4 b	76,2 ± 4,5 a	74,4 ± 3,9 b
T1	72,6 ± 3,8 b	74,6 ± 3,8 a	72,8 ± 4,2 b
T2	72,4 ± 2,5 a	74,1 ± 4,4 a	72,5 ± 3,8 a
T3	65,6 ± 14,9 a	68,3 ± 11,3 a	68,4 ± 12,7 a

(1) Letras minúsculas comparam médias dos grupos em cada momento

(*) Não houve diferença estatisticamente significativa entre momentos em cada grupo ($p > 0,05$)

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos GI, GII e GIII em todos os momentos na porcentagem de linearidade (LIN). Sendo observada uma redução significativa ($p < 0,05$) da linearidade em GII ($p < 0,05$) no momento T3 (tabela 10).

Tabela 10. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de linearidade (LIN) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	GII	GIII
T0	41,3 ± 3,8 A	42,9 ± 4,0 A	41,4 ± 3,3 A
T1	39,6 ± 3,2 A	40,5 ± 3,6 AB	40,7 ± 3,8 A
T2	38,9 ± 2,3 A	39,7 ± 3,2 AB	39,6 ± 3,8 A
T3	36,7 ± 6,0 A	36,3 ± 5,9 B	37,4 ± 7,5 A

(1) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

(*) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada momento ($p > 0,05$)

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

A porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP) foi igual entre os grupos em todos os momentos ($p > 0,05$). Entretanto, o RAP diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em todos os grupos com o passar do tempo (Tabela 11).

Tabela 11. Média e desvio padrão referentes à porcentagem de espermatozóides com movimento rápido (RAP) segundo os diferentes grupos (GI, GII e GIII) e momentos, sendo logo após a descongelação ou diluição (T0), após uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas da descongelação ou diluição.

Momento	Grupo		
	GI	GII	GIII
T0	43,4 ± 8,2 A	45,5 ± 11,2 A	42,0 ± 8,6 A
T1	33,7 ± 9,4 B	38,4 ± 9,5 AB	36,0 ± 7,5 A
T2	27,0 ± 12,4 C	31,4 ± 13,8 B	24,4 ± 9,1 B
T3	20,4 ± 12,9 D	27,8 ± 13,6 B	19,7 ± 8,9 B

(1) Letras maiúsculas comparam médias dos momentos em cada grupo

(*) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada momento (p>0,05)

GI – Sêmen puro, sem diluição, após descongelação; GII – Sêmen diluído com meio Kenney após descongelação; GIII – Sêmen diluído com fluido folicular após descongelação

O nível de significância utilizado foi de 5%.

EXPERIMENTO 2 – Avaliação da população espermática no oviduto de éguas após a inseminação artificial, utilizando diferentes técnicas de inseminação com sêmen fresco e congelado de garanhões.

Parte I – População de espermatozóides no oviduto de éguas inseminadas com diferentes técnicas de inseminação, com sêmen congelado do garanhão A.

Não foram encontrados espermatozóides nos ovidutos das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero. No grupo em que as éguas foram inseminadas na extremidade do corno uterino com 20×10^6 espermatozóides móveis (GIB), foram encontrados espermatozóides no oviduto de duas éguas (40%; tabela 12), no grupo em que as éguas foram inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia (sobre a papila), foram encontrados espermatozóides no oviduto de apenas uma égua (25%; tabela 13) e no grupo em que as éguas foram inseminadas com 500×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero, encontrou-se espermatozóides em um dos ovidutos de duas éguas (50%; tabela 14).

Na tabela 15 observa-se que o número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides não variou significativamente ($p > 0,05$) entre os grupos, sendo encontrados espermatozóides em 2 de 5 ovidutos avaliados em GIB (40%), 1 de 4 ovidutos avaliados em GIC (25%), 2 de 8 ovidutos avaliados em GID (25%) e em nenhum oviduto avaliado em GIA, bem como, não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) na média de espermatozóides por oviduto (considerando todos os ovidutos avaliados) entre os grupos, sendo encontrado uma média de 4500 espermatozóides por oviduto em GIB, 2500 em GIC, 1250 em GID e nenhum espermatozóide em GIA.

Devido aos resultados obtidos nesta parte do experimento, onde foram encontrados espermatozóides no oviduto de poucas éguas, independente da técnica de inseminação utilizada, foi realizada a parte II deste experimento, utilizando sêmen fresco e congelado do garanhão B, o que permitiria avaliar melhor como se dá o transporte espermático nas diferentes técnicas de inseminação, utilizando um baixo número de espermatozóides, oriundos de sêmen fresco e congelado de um mesmo garanhão.

Tabela 12. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis na extremidade do corno uterino (IAPC), grupo GIB, com sêmen congelado do garanhão A.

Animal	Oviduto (lado da inseminação)	Número de espermatozóides encontrados
120-61	Direito	0
120-61	Esquerdo	0
128-71	Direito	0
128-71	Esquerdo	15.000
190-72	Direito	7.500

GIB – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL – sêmen congelado (garanhão do teste de fertilidade) – IAPC

Tabela 13. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia (IAH), grupo GIC, com sêmen congelado do garanhão A.

Animal	Oviduto (lado da inseminação)	Número de espermatozóides encontrados
152-57	Direito	10.000
193-74	Direito	0
188-70	Direito	0
201-64	Direito	0

GIC – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL – sêmen congelado (garanhão do teste de fertilidade) – IAH

Tabela 14. Número de espermatozóides encontrados no lavado dos ovidutos direito e esquerdo das éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero (IACU), grupo GID, com sêmen congelado do garanhão A.

Animal	Número de espermatozóides encontrados	
	Oviduto Esquerdo ^a	Oviduto Direito ^a
148-67	0	5.000
061-66	0	0
102-69	0	0
196-55	5.000	0

GID – 500×10^6 espermatozóides móveis – 4,0 mL – sêmen congelado (garanhão do teste de fertilidade) – IACU
Estatística ANOVA ($p > 0,05$). Letras comparam a média de espermatozóides que migraram para os dois ovidutos

Tabela 15. Número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, dos grupos GIA, GIB, GIC e GID, realizados na Parte I do experimento 2, em que as éguas foram inseminadas com sêmen congelado do garanhão A.

Grupo	Técnica de inseminação	Nº. de espermatozóides utilizados	Nº. de ovidutos avaliados	Nº. de ovidutos com espermatozóides (%)	Média de espermatozóides por oviduto
GIA	IACU	20×10^6	8	0 (0%) ^a	0 ^a
GIB	IAPC	20×10^6	5	2 (40%) ^a	4500 ^a
GIC	IAH	20×10^6	4	1 (25%) ^a	2500 ^a
GID	IACU	500×10^6	8	2 (25%) ^a	1250 ^a
Total			25	5	

GIA- 20×10^6 espermatozóides móveis - 0,5mL - IACU

GIB- 20×10^6 espermatozóides móveis - 0,5mL - IAPC

GIC- 20×10^6 espermatozóides móveis - 0,5mL – IAH

GID- 500×10^6 espermatozóides móveis – 4,0mL – IACU

IACU- inseminação no corpo do útero; IAPC- inseminação na ponta do corno uterino; IAH- inseminação histeroscópica.

Estatística: Teste Exato de Fisher para o número de ovidutos com espermatozóides ($p > 0,05$); ANOVA para a média de espermatozóides por oviduto ($p > 0,05$)

As letras comparam o número de ovidutos com espermatozóides entre os grupos e a média de espermatozóides por oviduto entre os grupos

Parte II – População de espermatozóides no oviduto de éguas inseminadas com diferentes técnicas de inseminação, com sêmen fresco e congelado do garanhão B.

Após as inseminações com sêmen fresco do garanhão B, foram encontrados espermatozóides no oviduto de 2 éguas (40%) inseminadas na extremidade do corno uterino (GIIB; 20×10^6 ; Tabela 16) e de 2 éguas (50%) inseminadas por histeroscopia, sobre a papila (GIIC; 20×10^6 ; Tabela 17). Porém, quando as éguas foram inseminadas no corpo do útero (GIIA; 20×10^6) não foram encontrados espermatozóides nos ovidutos.

Na tabela 19 observa-se que o número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides não variou significativamente ($p > 0,05$) entre os grupos, sendo encontrados espermatozóides em 2 de 5 ovidutos avaliados em GIIB (40%), 2 de 4 ovidutos avaliados em GIIC (50%), 8 de 10 ovidutos avaliados em GIID (500×10^6 ; IACU) e em nenhum oviduto avaliado em GIIA. A média de espermatozóides por oviduto (considerando todos os ovidutos avaliados) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em GIID (7750 espermatozóides) do que em GIIA (zero), GIIB (1000) e GIIC (1875).

Não foram encontrados espermatozóides nos ovidutos das éguas inseminadas através de inseminação intraperitoneal com sêmen fresco do garanhão B (GIIE; 100×10^6).

Não encontrou-se espermatozóides nos ovidutos de nenhum dos grupos (GIIIA- 20×10^6 IACU; GIIIB- 20×10^6 IAPC; GIIC- 20×10^6 IAH e GIID- 500×10^6 IACU) inseminados com sêmen congelado do garanhão B.

O número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides (considerando todos ovidutos avaliados), ao comparar sêmen fresco e congelado do garanhão B, foi significativamente superior ($p < 0,05$) apenas no grupo em que as éguas foram inseminadas com 500×10^6 espermatozóides no corpo do útero com sêmen fresco (GIID), do que com 500×10^6 espermatozóides no corpo do útero sêmen congelado (GIID). Entretanto, a média de espermatozóides por oviduto foi significativamente superior ($p < 0,05$), com a utilização de sêmen fresco, no grupo em que as éguas foram inseminadas na ponta do corno com 20×10^6 espermatozóides, no grupo em que foram inseminadas por histeroscopia com 20×10^6 espermatozóides e no grupo em que foram inseminadas com 500×10^6 espermatozóides no corpo do útero quando comparada à estes grupos com a utilização do sêmen congelado (tabela 20).

Na tabela 21 observa-se que o número médio de espermatozóides por oviduto, considerando apenas os ovidutos em que foram encontrados espermatozóides, não diferiu significativamente ($p>0,05$) entre o sêmen fresco e congelado, apenas no grupo em que as éguas foram inseminadas com 20×10^6 espermatozóides no corpo do útero. Sendo a média de espermatozóides encontrados por oviduto significativamente superior ($p<0,05$) nos demais grupos, quando utilizou-se sêmen fresco quando comparado com sêmen congelado

Quando comparou-se os resultados obtidos com a utilização do sêmen congelado do garanhão A e do garanhão B, observa-se que o número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides não diferiu ($p>0,05$) estatisticamente entre os garanhões em nenhum dos grupos. Entretanto, a média de espermatozóides por oviduto foi significativamente superior ($p<0,05$), com a utilização de sêmen congelado do garanhão A, no grupo em que as éguas foram inseminadas na ponta do corno com 20×10^6 espermatozóides, no grupo em que foram inseminadas por histeroscopia com 20×10^6 espermatozóides e no grupo em que foram inseminadas com 500×10^6 espermatozóides no corpo do útero (tabela 22).

Tabela 16. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis na extremidade do corno uterino (IAPC), grupo GIIB, com sêmen fresco do garanhão B.

Animal	Oviduto (lado da inseminação)	Número de espermatozóides encontrados
77-631	Direito	0
86-619	Direito	0
78-552	Direito	2.500
84-668	Direito	0
80-632	Esquerdo	2.500

GIIB – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL – sêmen fresco – IAPC

Tabela 17. Número de espermatozóides encontrados no lavado do oviduto ipsilateral à inseminação, das éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia (IAH), grupo GIIC, com sêmen fresco do garanhão B.

Animal	Oviduto (lado da inseminação)	Número de espermatozóides encontrados
166-527	Esquerdo	0
154-534	Direito	0
168-477	Direito	5.000
114-388	Direito	2.500

GIIC – 20×10^6 espermatozóides móveis – 0,5 mL – sêmen fresco – IAH

Tabela 18. Número de espermatozóides encontrados no lavado dos ovidutos direito e esquerdo das éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero (IACU), grupo GIID, com sêmen fresco do garanhão B.

Animal	Número de espermatozóides encontrados	
	Oviduto Esquerdo^a	Oviduto Direito^a
85-625	10.000	17.500
82-664	2.500	0
79-672	2.500	0
83-673	12.500	7.500
81-677	5.000	20.000

GIID – 500×10^6 espermatozóides móveis – 10 mL – sêmen fresco – IACU

Estatística ANOVA ($p > 0,05$). Letras comparam a média de espermatozóides que migraram para os dois ovidutos

Tabela 19. Número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, dos grupos GIIA, GIIB, GIIC e GIID, realizados na Parte II do experimento 2, em que as éguas foram inseminadas com sêmen fresco do garanhão B.

Grupo	Técnica de inseminação	Nº. de espermatozóides utilizados	Nº. de ovidutos avaliados	Nº. de ovidutos com espermatozóides (%)	Média de espermatozóides por oviduto
GIIA	IACU	20x10 ⁶	10	0 (0%) ^a	0 ^b
GIIB	IAPC	20x10 ⁶	5	2 (40%) ^{ab}	1000 ^b
GIIC	IAH	20x10 ⁶	4	2 (50%) ^b	1875 ^b
GIID	IACU	500x10 ⁶	10	8 (80%) ^b	7750 ^a
Total			29	12	

GIIA- 20x10⁶ espermatozóides móveis - 0,5mL - IACU

GIIB- 20x10⁶ espermatozóides móveis - 0,5mL - IAPC

GIIC- 20x10⁶ espermatozóides móveis - 0,5mL - IAH

GIID- 500x10⁶ espermatozóides móveis - 10,0mL - IACU

IACU- inseminação no corpo do útero; IAPC- inseminação na ponta do corno uterino; IAH- inseminação histeroscópica.

Estatística: Teste Exato de Fisher para o número de ovidutos com espermatozóides (p>0,05); ANOVA para a média de espermatozóides por oviduto (p>0,05). As letras comparam o número de ovidutos com espermatozóides entre os grupos e a média de espermatozóides por oviduto entre os grupos

Tabela 20. Número total de ovidutos avaliados, número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, das éguas inseminadas com sêmen congelado e fresco do garanhão B, utilizando diferentes técnicas de inseminação.

Técnica de inseminação / dose inseminante	Nº. de ovidutos avaliados		Nº. de ovidutos com espermatozóides (%)*		Média de espermatozóides por oviduto**	
	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco
IACU / 20x10 ⁶	8	10	0 (0%) ^a	0 (0%) ^a	0 ^A	0 ^A
IAPC / 20x10 ⁶	4	5	0 (0%) ^a	2 (40%) ^a	0 ^A	1000 ^B
IAH / 20x10 ⁶	4	4	0 (0%) ^a	2 (50%) ^a	0 ^A	1875 ^B
IACU / 500x10 ⁶	8	10	0 (0%) ^a	8 (80%) ^b	0 ^A	7750 ^B

IACU – inseminação no corpo do útero; IAPC – inseminação na ponta do corno uterino; IAH – inseminação histeroscópica.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) no número de ovidutos com espermatozóides entre sêmen fresco e congelado em cada técnica de inseminação/dose inseminante. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na média de espermatozóides por oviduto entre sêmen fresco e congelado em cada técnica de inseminação/dose inseminante.

* Utilizou-se para comparar o número (pode também ser %) dos ovidutos com e sem espermatozóides o teste exato de Fisher ($p < 0,05$);

** Para se comparar as médias de espermatozóides por oviduto utilizou-se ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 21. Número de ovidutos que continham espermatozóides e número médio de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando apenas os ovidutos em que foram encontrados espermatozóides, das éguas inseminadas com sêmen congelado e fresco do garanhão B, utilizando diferentes técnicas de inseminação.

Técnica de inseminação / dose inseminante	N ^o . de ovidutos contendo espermatozóides (N ^o . total ovidutos) *		N ^o . médio de espermatozóides por oviduto **	
	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco
IACU / 20x10 ⁶	0 (8) ^a	0 (10) ^a	0 ^A	0 ^A
IAPC / 20x10 ⁶	0 (4) ^a	2 (5) ^a	0 ^A	2500 ^B
IAH / 20x10 ⁶	0 (4) ^a	2 (4) ^a	0 ^A	3750 ^B
IACU / 500x10 ⁶	0 (8) ^a	8 (10) ^b	0 ^A	9687,5 ^B

IACU – inseminação no corpo do útero; IAPC – inseminação na ponta do corno uterino; IAH – inseminação histeroscópica.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) no número de ovidutos com espermatozóides entre sêmen fresco e congelado em cada técnica de inseminação/dose inseminante. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na média de espermatozóides por oviduto entre sêmen fresco e congelado em cada técnica de inseminação/dose inseminante.

* Utilizou-se para comparar o número (pode também ser %) dos ovidutos com espermatozóides o teste exato de Fisher ($p < 0,05$);

** Para se comparar as médias de espermatozóides por oviduto utilizou-se ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 22. Número total de ovidutos avaliados, número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides e média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, das éguas inseminadas com sêmen congelado do garanhão A e com sêmen congelado do garanhão B, utilizando diferentes técnicas de inseminação.

Técnica de inseminação / dose inseminante	N ^o . de ovidutos avaliados		N ^o . de ovidutos com espermatozóides*		Média de espermatozóides por oviduto**	
	Garanhão A	Garanhão B	Garanhão A	Garanhão B	Garanhão A	Garanhão B
IACU / 20x10 ⁶	8	8	0 ^a	0 ^a	0 ^A	0 ^A
IAPC / 20x10 ⁶	5	4	2 ^a	0 ^a	4500 ^A	0 ^B
IAH / 20x10 ⁶	4	4	1 ^a	0 ^a	2500 ^A	0 ^B
IACU / 500x10 ⁶	8	8	2 ^a	0 ^a	1250 ^A	0 ^B

IACU – inseminação no corpo do útero; IAPC – inseminação na ponta do corno uterino; IAH – inseminação histeroscópica.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) no número de ovidutos com espermatozóides entre sêmen congelado do garanhão A e B, em cada técnica de inseminação/dose inseminante. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na média de espermatozóides por oviduto entre sêmen congelado do garanhão A e B, em cada técnica de inseminação/dose inseminante.

* Utilizou-se para comparar o número (pode também ser %) dos ovidutos com e sem espermatozóides o teste exato de Fisher ($p < 0,05$);

** Para se comparar as médias de espermatozóides por oviduto utilizou-se ANOVA ($p < 0,05$).

Parte III – Avaliação da recuperação espermática após inseminações artificiais intrafoliculares (IAIF), *in vitro*, com sêmen congelado do garanhão A.

Foi observado um grande extravasamento de fluido folicular, através do orifício formado pela agulha (30x8) no momento da inseminação. Devido a este fato, o volume de fluido folicular recuperado três horas após as inseminações foi inferior ao volume esperado de folículos que inicialmente possuíam de 35 a 40 mm de diâmetro (Tabela 23). A média de espermatozóides recuperados foi de $4,827 \times 10^6$, o que representa apenas 24,13% dos 20×10^6 espermatozóides injetados nos folículos no momento das inseminações. O desvio padrão foi de $3,533 \times 10^6$ e a mediana $4,172 \times 10^6$.

Tabela 23. Número de espermatozóides recuperados três horas após inseminações intrafoliculares (IAIF) *in vitro*, em folículos de 35 a 40 mm de diâmetro, com 20×10^6 espermatozóides móveis, oriundos de sêmen congelado de um garanhão A.

Número do Folículo	Volume de Fluido Folicular Recuperado (mL)	Número de Espermatozóides Recuperados
Folículo 1	1,0	$4,7 \times 10^6$
Folículo 2	2,2	$8,03 \times 10^6$
Folículo 3	7,5	$9,75 \times 10^6$
Folículo 4	5,5	137.500
Folículo 5	2,7	$3,645 \times 10^6$
Folículo 6	0,75	$2,7 \times 10^6$

EXPERIMENTO 3 – Teste de fertilidade entre diferentes técnicas de inseminação artificial utilizando um baixo número de espermatozóides.

Não foi observado prenhez nos grupos em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intrafolicular (GIV) e inseminação intraperitoneal (GV). Entretanto as porcentagens de prenhez de GI (IACU; 20×10^6), GII (IAPC; 20×10^6) e GIII (IAH; 20×10^6) foram respectivamente de 15%, 40% e 45% (Tabela 24).

Na tabela 24 observa-se que a porcentagem de prenhez de GI foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) a GII e GIII, não se diferenciando ($p > 0,05$) também de GIV e GV. As porcentagens de prenhez de GII e GIII foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) entre si e significativamente superior ($p < 0,05$) às porcentagens de prenhez dos grupos GIV e GV.

Tabela 24. Porcentagem de éguas prenhes inseminadas pelo método convencional (IACU), na extremidade do corno uterino ipsilateral à ovulação (IAPC), por histeroscopia (IAH), deposição do sêmen dentro do folículo pré-ovulatório (IAIF) e deposição do sêmen sobre o ovário contendo um folículo pré-ovulatório (IAIP).

Grupo	Técnica de Inseminação	Número de éguas inseminadas	Número de éguas prenhes	Porcentagem de prenhez (%) **
GI	IACU	20	3	15% ab
GII	IAPC	20	8	40% a
GIII	IAH	20	9	45% a
GIV	IAIF	20	0	0% b
GV	IAIP	20	0	0% b

GI – IACU – 20×10^6 espermatozóides móveis – sêmen congelado

GII – IAPC – 20×10^6 espermatozóides móveis – sêmen congelado

GIII – IAH – 20×10^6 espermatozóides móveis – sêmen congelado

GIV – IAIF – 20×10^6 espermatozóides móveis – sêmen congelado

GV – IAIP – 100×10^6 espermatozóides móveis – sêmen fresco

** A porcentagem de prenhez dos diferentes grupos, seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

EXPERIMENTO 4 – Avaliação da reação inflamatória na cavidade peritoneal, após as inseminações intrafoliculares e intraperitoneais

Resultados das análises laboratoriais, das amostras colhidas de 15 éguas, antes (T0) e 6 horas após (T6) as mesmas serem inseminadas através da inseminação artificial intraperitoneal (IAIP).

No momento T0, 12 amostras apresentavam cor amarelada e 3 apresentavam cor avermelhada. Entretanto, no momento T6, 8 amostras apresentaram cor amareladas e 7 avermelhadas. Em T0, 11 amostras apresentavam aspecto turvo e 4 aspecto límpido e em T6 todas as amostras apresentavam aspecto turvo.

A concentração de fibrinogênio nas amostras em T0 se deu da seguinte forma, 4 amostras com 200 mg/dL, 1 amostra com 100 mg/dL e 10 amostras com menos de 100 mg/dL. No momento T6 a concentração de fibrinogênio nas amostras se apresentaram da seguinte forma, 5 amostras com 200 mg/dL, 9 amostras com menos de 100 mg/dL e 1 amostra com 400 mg/dL.

No momento T0, 6 amostras apresentaram coagulação positiva e em T6 este número foi de apenas 2 amostras. Foi observado leucofagocitose em 13 amostras e eritrofagocitose em 2 amostras no momento T0, não sendo observado nem leucofagocitose e nem eritrofagocitose em 2 amostras neste momento. Em T6, 12 amostras não apresentaram nem leucofagocitose e nem eritrofagocitose, sendo que 3 amostras apresentaram leucofagocitose e 1 amostra apresentou eritrofagocitose.

A média, desvio padrão, estatística T e valor de p das variáveis densidade, concentração de proteína, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do grupo em que foi realizado inseminação intraperitoneal, antes do momento da inseminação (GIP0) e 6 horas após a inseminação intraperitoneal (GIP6), estão apresentados na tabela 25. A mediana, primeiro quartil, terceiro quartil (entre colchetes), estatística de Wilcoxon e valor de p das variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilos do grupo em que foi realizado inseminação intraperitoneal, antes do momento da inseminação (GIP0) e 6 horas após a inseminação intraperitoneal (GIP6), estão apresentados na tabela 26.

Tabela 25. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intraperitoneal, segundo os momentos zero (GIP0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intraperitoneal (GIP6)

Variável	Momentos		t	p
	GIP0	GIP6		
Densidade	1014,5 ± 3,3	1017,7 ± 4,9	- 2,2	0,042
Proteína	648,7 ± 476,5	1146,7 ± 642,4	- 2,7	0,016
Células	1571,3 ± 1183,3	25238,7 ± 21053,2	- 4,3	0,001
Neutrófilos	46,3 ± 14,4	84,3 ± 11,1	- 8,3	0,001
Macrófagos	46,7 ± 15,0	11,8 ± 10,2	7,6	0,001
Linfócito	6,5 ± 3,5	4,1 ± 3,6	2,0	0,061

P≤0,05 – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

Tabela 26. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intraperitoneal, segundo os momentos zero (GIP0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intraperitoneal (GIP6)

Variável	Momentos		W	p
	GIP0	GIP6		
PH	8,0 [8,0; 8,0]	7,5 [7,1; 8,0]	- 36,0	0,008
Glicose	50,0 [50,0; 100,0]	50,0 [50,0; 50,0]	- 12,0	0,461
Sangue	3,0 [3,0; 3,0]	3,0 [3,0; 3,0]	3,0	0,5
Hemácia	3270,0 [607,5; 6152,5]	10700,0 [5637,5; 48737,5]	84,0	0,015
Eosinófilo	0,0 [0,0; 1,0]	0,0 [0,0; 0,0]	- 15,0	0,063

P≤0,05 – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

De todos os parâmetros avaliados somente a porcentagem de linfócitos e eosinófilos, a concentração de glicose e a presença de sangue não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre o momento T0 (GIP0) e 6 horas após as inseminações intraperitoneais (GIP6).

Resultados das análises laboratoriais, das amostras colhidas de 14 éguas, antes (T0) e 6 horas após (T6) as mesmas serem inseminadas através da inseminação artificial intrafolicular (IAIF).

No momento T0, 3 amostras apresentavam cor avermelhada e 11 amostras cor amarelada e em T6, 6 amostras apresentavam cor avermelhada e 8 amostras cor amarelada. Foi observado aspecto turvo em 5 amostras e aspecto límpido em 9 amostras em T0, já em T6, apenas uma amostra apresentou aspecto límpido.

A concentração de fibrinogênio de todas as amostras em T0 foi inferior a 100 mg/dL. Entretanto, em T6 a concentração de fibrinogênio se deu da seguinte forma, sendo 6 amostras com menos de 100 mg/dL, 3 amostras com 100 mg/dL e 5 amostras com 200 mg/dL.

Foi observado coagulação em 3 amostras em T0 e em 1 amostra no momento T6. Foi observado leucofagocitose em 13 amostras e eritrofagocitose em 4 amostras no momento T0, não sendo observado nem leucofagocitose e nem eritrofagocitose em 1 amostra neste momento. Em T6, 8 amostras não apresentaram nem leucofagocitose e nem eritrofagocitose, sendo que 6 amostras apresentaram leucofagocitose e 3 amostras apresentaram eritrofagocitose.

A média, desvio padrão, estatística T e valor de p das variáveis densidade, concentração de proteína, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do grupo em que foi realizado inseminação intrafolicular, antes do momento da inseminação (GIF0) e 6 horas após a inseminação intrafolicular (GIF6), estão apresentados na tabela 27. A mediana, primeiro quartil, terceiro quartil (entre colchetes), estatística de Wilcoxon e valor de p das variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilos do grupo em que foi realizado inseminação intrafolicular, antes do momento da inseminação (GIF0) e 6 horas após a inseminação intrafolicular (GIF6), estão apresentados na tabela 28.

Tabela 27. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intrafolicular, segundo os momentos zero (GIF0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intrafolicular (GIF6)

Variável	Momentos		t	p
	GIF0	GIF6		
Densidade	1012,4 ± 2,6	1019,6 ± 4,2	- 6,3	0,001
Proteína	478,6 ± 263,6	1314,3 ± 776,4	- 3,4	0,004
Células	1108,7 ± 1048,7	35966,8 ± 27805, 4	- 4,8	0,001
Neutrófilos	54,6 ± 22,4	84,57 ± 14,9	- 3,5	0,004
Macrófagos	37,2 ± 25,4	10,6 ± 11,04	3,2	0,006
Linfócito	8,1 ± 5,6	4,8 ± 5,9	1,6	0,138

P≤0,05 – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

Tabela 28. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo em que foi realizado inseminação intrafolicular, segundo os momentos zero (GIF0, antes do momento da inseminação) e 6 horas após a inseminação intrafolicular (GIF6)

Variável	Momentos		W	p
	GIF0	GIF6		
PH	7,5 [7,5; 8,0]	7,5 [7,0; 7,5]	- 48,0	0,01
Glicose	100,0 [50,0; 100,0]	50,0 [30,0; 50,0]	- 41,0	0,037
Sangue	2,0 [1,0; 3,0]	3,0 [3,0; 3,0]	28,0	0,016
Hemácia	300,0 [60,0; 1700,0]	9185,0 [3533,0; 33000,0]	105,0	0,001
Eosinófilo	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,0]	-3,0	0,5

P≤0,05 – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

De todos os parâmetros avaliados somente a porcentagem de linfócitos e eosinófilos não diferiram estatisticamente entre o momento T0 (GIF0) e 6 horas após as inseminações intrafoliculares (GIF6).

Comparação da reação inflamatória causada pela inseminação intrafolicular e intraperitoneal, através da avaliação dos resultados obtidos da análise do líquido peritoneal de ambos os grupos, 6 horas após as inseminações (T6).

A tabela 29 nos mostra a média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal 6 horas após as inseminações dos grupos em que foram realizados inseminação intraperitoneal (GIP6) e inseminação intrafolicular (GIF6). A tabela 30 nos mostra a mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Man-Whitney e valor de p para as variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilo do líquido peritoneal 6 horas após as inseminações dos grupos em que foram realizados inseminação intraperitoneal (GIP6) e inseminação intrafolicular (GIF6).

Tabela 29. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal 6 horas após as inseminações dos grupos em que foram realizados inseminação intraperitoneal (GIP6) e inseminação intrafolicular (GIF6)

Variável	Grupos		t	p
	GIP6	GIF6		
Densidade	1017,7 ± 4,9	1019,6 ± 4,2	- 1,08	0,287
Proteína	1146,7 ± 642,4	1314,3 ± 776,4	- 0,635	0,531
Células	25238,7 ± 21053,2	35966,8 ± 27805, 4	- 1,177	0,250
Neutrófilos	84,3 ± 11,1	84,57 ± 14,9	- 0,049	0,961
Macrófagos	11,8 ± 10,2	10,6 ± 11,04	0,311	0,758
Linfócito	4,1 ± 3,6	4,8 ± 5,9	- 0,441	0,663

P≤0,05 – os valores dos grupos se diferem estatisticamente

Tabela 30. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Man-Whitney e valor de p para as variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilo do líquido peritoneal 6 horas após as inseminações dos grupos em que foram realizados inseminação intraperitoneal (GIP6) e inseminação intrafolicular (GIF6).

Variável	Grupos		T	p
	GIP6	GIF6		
PH	7,5 [7,1; 8,0]	7,5 [7,0; 7,5]	174,5	0,126
Glicose	50,0 [50,0; 50,0]	50,0 [30,0; 50,0]	201,5	0,726
Sangue	3,0 [3,0; 3,0]	3,0 [3,0; 3,0]	210,0	0,982
Hemácia	10700,0 [5637,5; 48737,5]	9185,0 [3533,0; 33000,0]	201,0	0,711
Eosinófilo	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,0]	210,0	0,982

$p \leq 0,05$ – os valores dos grupos se diferem estatisticamente

Nenhum dos parâmetros avaliados diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os grupos GIP6 e GIF6.

Resultados das análises laboratoriais, das amostras colhidas de 4 éguas, as quais não foram inseminadas e não ovularam entre a primeira e a segunda paracentese (grupo controle: GC), sendo o momento da primeira paracentese considerado T0 e o momento da segunda paracentese considerado T6, as quais foram realizadas 6 horas após T0.

No momento T0, 2 amostras apresentaram cor amarelada e 2 avermelhada e no momento T6 3 amostras apresentaram cor amarelada e 1 amostra cor avermelhadas. Foi observado aspecto límpido em 2 amostras e aspecto turvo em 2 amostras em T0 e em T6, aspecto límpido em 3 amostras e trurvo em apenas uma amostra.

Nos momentos T0 e T6, a concentração de fibrinogênio em todas as amostras foi inferior a 100 mg/dL. Observou-se coagulação em apenas uma amostra tanto em T0 quanto em T6. Não foi observado eritrofagocitose em nenhuma amostra em nenhum dos momentos, sendo observado leucofagocitose em 2 amostras em T0 e em T6. Em ambos os momentos em 2 amostras não foram observados nem leucofagocitose e nem eritrofagocitose.

A média, desvio padrão, estatística T e valor de p das variáveis densidade, concentração de proteína, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do grupo controle em diestro, no qual as éguas não foram inseminadas

e nem ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GC0) e 6 horas após (segunda paracentese, GC6), estão apresentados na tabela 31. A mediana, primeiro quartil, terceiro quartil (entre colchetes), estatística de Wilcoxon e valor de p das variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilos do grupo controle em diestro, no qual as éguas não foram inseminadas e nem ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GC0) e 6 horas após (segunda paracentese, GC6), estão apresentados na tabela 32.

Tabela 31. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo controle em diestro, no qual as éguas não foram inseminadas e nem ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GC0) e 6 horas após (segunda paracentese, GC6).

Variável	Momentos		t	P
	GC0	GC6		
Densidade	1014,2 ± 3,3	1014,5 ± 1,9	- 0,293	0,789
Proteína	650,0 ± 300,0	650,0 ± 173,2	0,0	1,0
Células	1482,5 ± 348,7	3705,0 ± 5525,3	- 0,85	0,455
Neutrófilos	69,25 ± 12,7	84,0 ± 2,6	- 2,49	0,088
Macrófagos	27,2 ± 12,2	12,0 ± 4,2	2,152	0,121
Linfócito	3,5 ± 1,9	2,2 ± 1,2	1,213	0,312

P≤0,05 – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

Tabela 32. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo controle em diestro, no qual as éguas não foram inseminadas e nem ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GC0) e 6 horas após (segunda paracentese, GC6).

Variável	Momentos		W	p
	GC0	GC6		
PH	8,0 [8,0; 8,0]	8,0 [7,7; 8,0]	- 1,0	1,0
Glicose	50,0 [50,0; 75,0]	100,0 [100,0; 100,0]	6,0	0,25
Sangue	3,0 [2,5; 3,0]	3,0 [2,5; 3,0]	0,0	1,0
Hemácia	4610,0 [505,0; 59275,0]	900,0 [340,0; 27415,0]	- 6,0	0,375
Eosinófilo	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,5]	1,0	1,0

$P \leq 0,05$ – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

Nenhum dos parâmetros avaliados diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os momentos GC0 e GC6.

Resultados das análises laboratoriais, das amostras colhidas de 3 éguas, as quais não foram inseminadas e ovularam entre a primeira e a segunda paracentese (grupo controle ovulação: GCO), sendo o momento da primeira paracentese considerado T0 e o momento da segunda paracentese considerado T6, as quais foram realizadas 6 horas após T0.

No momento T0, 2 amostras apresentaram cor amarelada e 1 avermelhada e no momento T6 1 amostras apresentou cor amarelada e 2 amostras cor avermelhadas. Foi observado aspecto límpido em 2 amostras e aspecto turvo em 1 amostra em T0 e em T6, todas as amostras estavam com aspecto turvo.

Nos momentos T0 e T6, a concentração de fibrinogênio em todas as amostras foi inferior a 100 mg/dL. Observou-se coagulação em apenas uma amostra tanto em T0 quanto em T6. Não foi observado eritrofagocitose em nenhuma amostra em nenhum dos momentos, sendo observado leucofagocitose em todas as amostras em T0 e em 1 amostra no momento T6. Em T6, 2 amostras não apresentaram nem leucofagocitose e nem eritrofagocitose.

A média, desvio padrão, estatística T e valor de p das variáveis densidade, concentração de proteína, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do grupo controle ovulação, no qual as éguas não foram inseminadas, mas ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GCO0) e 6 horas após (segunda paracentese, GCO6), estão apresentados na tabela 33. A mediana, primeiro quartil, terceiro quartil (entre colchetes), estatística de Wilcoxon e valor de p das variáveis pH, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias e porcentagem de eosinófilos do grupo controle ovulação, no qual as éguas não foram inseminadas, mas ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GCO0) e 6 horas após (segunda paracentese, GCO6), estão apresentados na tabela 34.

Tabela 33. Média, desvio padrão, estatística T e valor de p para as variáveis densidade, concentração de proteínas, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos e linfócitos do líquido peritoneal do grupo controle ovulação, no qual as éguas não foram inseminadas, mas ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GCO0) e 6 horas após (segunda paracentese, GCO6).

Variável	Momentos		t	P
	GCO0	GCO6		
Densidade	1014,0 ± 2,0	1015,3 ± 1,1	- 2,0	0,184
Proteína	500,0 ± 0,0	766,7 ± 251,7	- 1,835	0,208
Células	3340,0 ± 1880,2	4320,0 ± 2096,2	- 1,156	0,367
Neutrófilos	58,0 ± 9,8	78,7 ± 78,1	- 2,2	0,157
Macrófagos	34,0 ± 12,5	13,7 ± 6,6	3,1	0,089
Linfócito	8,0 ± 6,1	7,3 ± 4,2	0,173	0,878

P≤0,05 – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

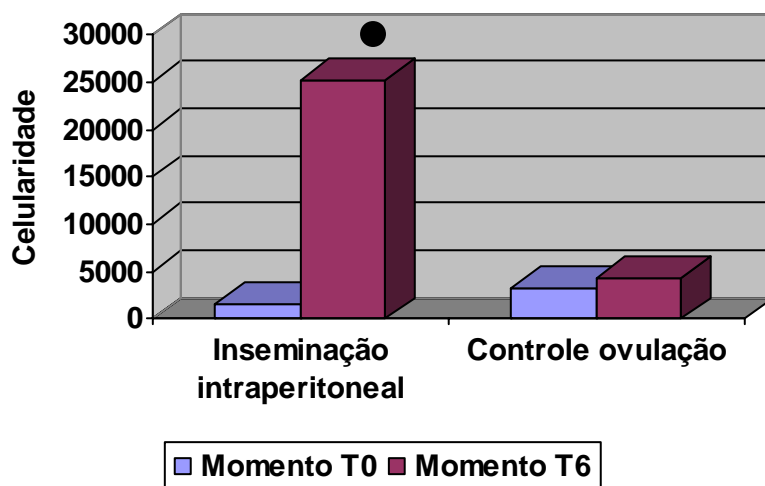
Tabela 34. Mediana, primeiro e terceiro quartil (entre colchetes), estatística Wilcoxon (W) e valor de p para as variáveis pH, glicose, presença de sangue, número de hemácias e porcentagem de eosinófilos do líquido peritoneal do grupo controle ovulação, no qual as éguas não foram inseminadas, mas ovularam entre a primeira e a segunda paracentese, no momento zero (primeira paracentese, GCO0) e 6 horas após (segunda paracentese, GCO6).

Variável	Momentos		W	p
	GCO0	GCO6		
PH	8,0 [8,0; 8,0]	8,0 [8,0; 8,0]	0,0	1,0
Glicose	50,0 [50,0; 87,5]	100,0 [62,5; 100,0]	1,0	1,0
Sangue	3,0 [3,0; 3,0]	3,0 [3,0; 3,0]	0,0	1,0
Hemácia	4750,0 [1525,0; 40562,5]	18700,0 [7337,5; 21175,0]	0,0	1,0
Eosinófilo	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,7]	1,0	1,0

$P \leq 0,05$ – os valores dos momentos se diferem estatisticamente

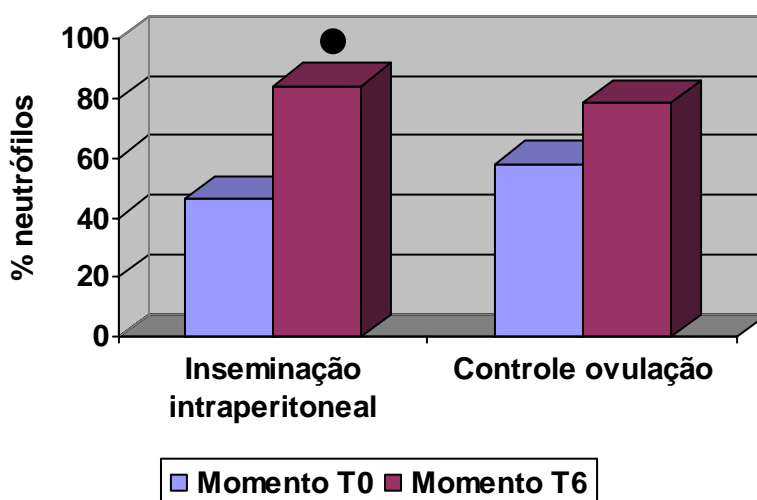
Nenhum dos parâmetros avaliados diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os momentos GCO0 e GCO6.

Figura 2. Valores médios da celularidade do líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intraperitoneal entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses.



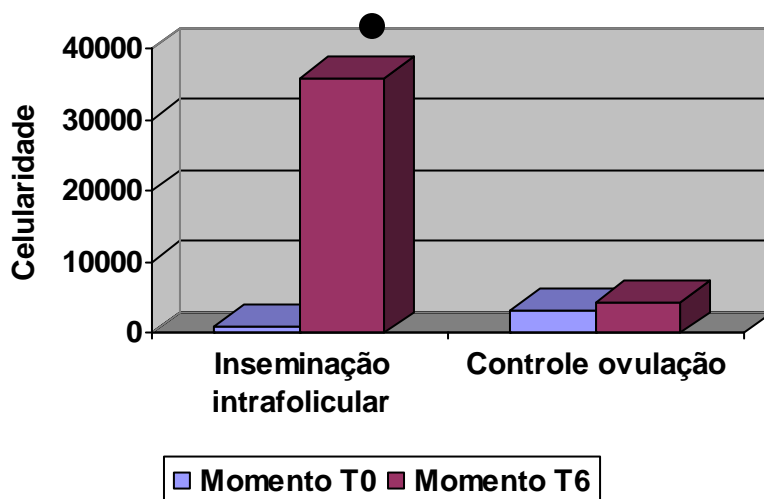
● Representa diferença estatística entre os momentos

Figura 3. Valores médios da porcentagem de neutrófilos no líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intraperitoneal entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses.



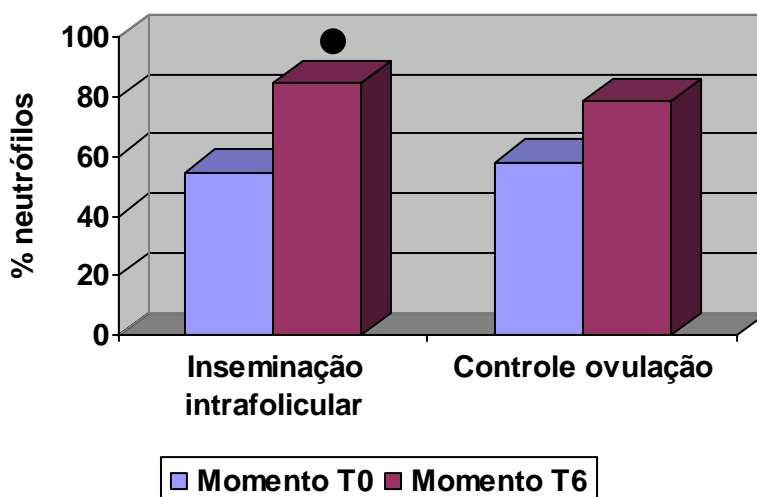
● Representa diferença estatística entre os momentos

Figura 4. Valores médios da celularidade do líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intrafolicular entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses.



● Representa diferença estatística entre os momentos

Figura 5. Valores médios da porcentagem de neutrófilos no líquido peritoneal no momento T0 (primeira paracentese) e no momento T6 (seis horas após T0), no grupo em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intrafolicular entre as paracenteses e no grupo controle em que as éguas não foram inseminadas, porém ovularam entre as paracenteses.



● Representa diferença estatística entre os momentos

EXPERIMENTO 5 – Efeito da deposição do sêmen congelado no folículo pré-ovulatório, sobre os índices de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco pelo método convencional.

Observa-se na tabela 35 que a porcentagem de prenhez de GA (50%) foi estatisticamente igual ($P>0,05$) à porcentagem de prenhez de GB (83,33%). Quando comparamos GA e GB com GIV, grupo realizado no experimento 3, no qual não obtivemos prenhez após as inseminações artificiais intrafoliculares, observamos que a porcentagem de prenhez de GIV foi significativamente inferior ($P<0,05$) às de GA e GB.

Tabela 35. Porcentagem de éguas prenhez inseminadas por inseminação intrafolicular (IAIF), pelo método convencional (IACU) com sêmen fresco de jumento concomitantemente com a inseminação intrafolicular (IAIF) utilizando sêmen congelado de garanhões e éguas inseminadas pelo método convencional (IACU) apenas com sêmen fresco de jumento.

Grupo	Número de éguas inseminadas	Número de éguas prenhes	Porcentagem de prenhez (%) **
GA	10	5	50% a
GB	18	15	83,33% a
GIV	20	0	0% b

GA – 20×10^6 espermatozóides móveis – IAIF – 0,5 mL – sêmen congelado de garanhão

500x10⁶ espermatozóides móveis – IACU – 15 mL – sêmen fresco de jumento

GB – 500×10^6 espermatozóides móveis – IACU – 15 mL – sêmen fresco de jumento

GIV – 20×10^6 espermatozóides móveis – IAIF – 0,5 mL – sêmen congelado de garanhão

** A porcentagem de prenhez dos diferentes grupos, seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da viabilidade do sêmen congelado de garanhões, quando diluído em fluido folicular de folículo pré-ovulatório de éguas.

Observa-se que logo após a diluição do sêmen (T0), o líquido folicular não causou danos na integridade de membrana plasmática dos espermatozóides, pois não foi detectado diferença estatística na porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra entre GI (46,6%) e GIII (46,0%).

A porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra foi semelhante entre os grupos, mostrando que a diluição em fluido folicular não induziu a reação acrossomal com uma hora de tratamento. A porcentagem de espermatozóides vivos com membrana acrossomal íntegra foi de 33,7% no grupo controle e 29,5% no grupo em que o sêmen foi diluído em fluido folicular uma hora após a diluição, sendo estes gametas o nosso principal alvo de observação, pois são estes os espermatozóides que estariam aptos para fertilizar o oócito. Entretanto, Yao et al. (1999) observaram que a porcentagem de reação acrossomal de espermatozóides de humanos, foi superior nos grupos tratados com hFF (fluido folicular humano) do que no grupo controle, após uma hora de tratamento, sendo que a porcentagem de reação acrossomal foi ainda maior no grupo tratado apenas com hFF do que no grupo tratado com hFF e células epiteliais do oviduto. Os resultados deste trabalho também contradizem os resultados obtidos por Yao et al. (2000) que observaram que a diluição do sêmen fresco de humanos em fluido folicular induziu a reação acrossomal em uma hora de tratamento.

Mesmo utilizando uma alta concentração de fluido folicular (50%), oriundo de folículo pré-ovulatório de égua, para o sêmen após a descongelação, não foi observado indução da reação acrossomal após uma hora de tratamento. Resultado este que contradiz os achados de Burello et al. (2004) que observaram que o hFF estimula a reação acrossomal de espermatozóides de humanos de forma dose dependente, sendo o maior efeito estimulatório observado com a utilização de 30% de hFF. Entretanto, Mununce et al. (2004), também não observaram diferença significativa na porcentagem de espermatozóides de homens com membrana acrossomal reagida entre o grupo controle e o grupo tratado com 50% de hFF.

Sabe-se que o fluido de um folículo pré-ovulatório contém altas concentrações de progesterona (Bogh et al., 2000) e a progesterona induz fisiologicamente a reação acrossomal em espermatozóides oriundos de sêmen fresco de garanhões (Rathi et al., 2001), entretanto,

não tem o mesmo efeito em sêmen congelado de bovinos (Lukoseviciute et al., 2004). Apesar da alta concentração de progesterona no fluido folicular pré-ovulatório de éguas, a diluição de sêmen congelado de garanhões neste fluido, não induziu a reação acrossomal uma hora após a diluição. Arns et al. (1991) também observaram que uma pequena porcentagem de espermatozóides de eqüinos diluídos em fluido folicular sofreram reação acrossomal após três horas de tratamento.

De acordo com Yao et al. (1999) o tratamento de sêmen humano com hFF, melhora todos os parâmetros de motilidade do sêmen, com exceção a linearidade. Entretanto, neste trabalho observou-se em GIII (grupo tratado com fluido folicular), melhora em apenas alguns parâmetros de motilidade como VAP nos momentos T0, 1 e 2, VSL nos momentos T0, 1 e 2, VCL nos momentos T0, 1 e 2 e BCF nos momentos T0, 1 e 2. Porém, no momento T3, não foi observado diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, entre os grupos.

Ao comparar a motilidade total dos grupos tratado com fluido folicular e controle, observa-se que este parâmetro foi significativamente superior no grupo controle apenas no momento T0. Entretanto, Landim-Alvarenga et al. (2001), trabalhando com sêmen de garanhões, observaram uma maior porcentagem de espermatozóides móveis no grupo tratado com fluido folicular após duas horas de incubação. A porcentagem de espermatozóides móveis reduziu da mesma forma em ambos os grupos (GI e GIII) com passar do tempo, diferindo dos resultados de Thérien et al. (2001) e McNutt & Killian (1991), que trabalhando com sêmen de humanos observaram uma redução mais rápida da motilidade quando o sêmen era tratado com fluido folicular. Da mesma forma que Mununce et al. (2004), não encontramos diferença significativa na porcentagem de espermatozóides de humanos com motilidade progressiva entre o grupo tratado com fluido folicular e o grupo controle, em nenhum momento.

Vários pesquisadores como Nichol et al. (1997), trabalhando com sêmen de suíno, Yao et al. (1999), trabalhando com sêmen humano e Yao et al. (2000), também utilizando sêmen humano, constataram que a diluição do sêmen em fluido folicular aumenta a velocidade espermática ao longo de uma trajetória real (VCL), o que também foi observado nos momentos T0, T1 e T2.

Os resultados mostram que os valores de VAP e VSL reduziram significativamente com o passar do tempo nos grupos (GI, GII e GIII), diferente dos resultados obtidos por Yao et al. (2000) que não observaram uma redução destes valores, em sêmen fresco de humanos, até 5 horas após a diluição em fluido folicular, encontrando uma redução significativa destes valores apenas no grupo não tratado. Observa-se que no grupo GIII (diluído em fluido

folicular) não houve uma redução significativa do VCL com o passar do tempo, como também foi observado por estes pesquisadores.

Yao et al. (2000) observaram que em todos os momentos a frequência de BCF foi significativamente superior, no grupo onde o sêmen humano foi diluído em fluido folicular quando comparado com o grupo controle, fato este que foi observado apenas nos momentos T0, T1 e T2, tendo esta diferença desaparecido no momento T3. Os resultados de ALH obtidos por este grupo de pesquisadores foram semelhante aos obtidos neste trabalho, onde não observou-se diferença entre o grupo controle sem diluição e o grupo tratado com fluido folicular em nenhum dos momentos avaliados, diferente do resultado obtido por Nichol et al. (1997), que observaram um ALH superior, quando o sêmen de suíno foi tratado com fluido folicular.

Com avaliações sucessivas do sêmen descongelado de garanhões, diluído em fluido folicular, observou-se que até três horas após a diluição, o fluido folicular não exerceu efeitos deletérios sobre a viabilidade do sêmen, quanto aos parâmetros de movimento avaliados como MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP, pois no momento T3 não houve diferença significativa entre o grupo controle GI (sem diluição) e o grupo tratado com fluido folicular (GIII) em nenhum destes parâmetros. Sendo detectado diferença significativa no momento T3, apenas na MP, onde o grupo controle GII (diluído em meio Kenney) apresentou uma porcentagem de MP significativamente maior que GI e GIII.

Devido ao fato de não ter sido observado diferença estatística em nenhum dos parâmetros de motilidade avaliados, entre os grupos controle (GI) e diluído em fluido folicular (GIII) após três horas e não haver diferença significativa entre GI e GIII na porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e na porcentagem de espermatozoides vivos com membrana acrossomal íntegra, foi decidido que seria realizado o teste de fertilidade com a inseminação artificial intrafolicular, pois através destes resultados concluiu-se que o fluido folicular pré-ovulatório de éguas, não é deletério à viabilidade espermática do sêmen congelado de garanhões, até três horas após a diluição. Baseados na hipótese de que o sêmen depositado dentro do folículo poderia migrar para o oviduto no momento da ovulação, as inseminações intrafoliculares foram realizadas apenas quando detectada a proximidade da ovulação, através de indução da ovulação, com palpções e avaliações ultra-sonográficas sucessivas.

5.2. Avaliação da população espermática no oviduto de éguas após a inseminação artificial, utilizando diferentes técnicas de inseminação, com sêmen fresco e congelado de garanhões.

Mesmo com a grande diferença do número de espermatozóides encontrados no oviduto das éguas inseminadas dentro do mesmo grupo, observa-se que as técnicas de inseminação na extremidade do corno uterino (GIB) e inseminação histeroscópica, sobre a junção útero-tubárica (GIC), apresentaram um transporte espermático mais eficiente no trato reprodutivo feminino, quando comparado com a inseminação convencional (GIA), utilizando uma baixa dose de sêmen congelado do garanhão A (20×10^6 espermatozóides móveis), pois em GIB (Tabela 12) foram encontrados espermatozóides no oviduto de 2 éguas (40%), em GIC (25%; Tabela 13) de uma égua e em GIA não foi encontrado espermatozóide nos ovidutos de nenhuma égua.

Através destes resultados, também observou-se que o número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides das éguas de GIB, as quais foram inseminadas com 500×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero, com sêmen congelado do garanhão A (Tabela 14) não foi maior do que o número de espermatozóides encontrados nos ovidutos das éguas de GIB (IAPC) e GIC (IAH), embora tenha sido utilizado um menor número de espermatozóides em GIB e GIC (4% da dose de sêmen utilizada em GIB), mostrando que a inseminação na extremidade do corno uterino e a inseminação histeroscópica são técnicas eficientes e viabilizam a utilização de um baixo número de espermatozóides oriundos de sêmen congelado de garanhões.

Observou-se a presença de espermatozóides em 2 ovidutos de GIB (50%; IACU; 500×10^6 ; Tabela 14) e não foi encontrado espermatozóide em nenhum oviduto de GIA (0%; IACU; 20×10^6), o que mostra que para utilização de um pequeno número de espermatozóides oriundos de sêmen congelado, a técnica de inseminação convencional não é eficiente.

Embora não tenha sido observado diferença estatística (tabela 15) entre os grupos GIA, GIB, GIC (sêmen congelado, garanhão A) na porcentagem de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides, podemos observar uma diferença numérica, sendo encontrados espermatozóides em uma maior porcentagem de ovidutos em GIB (40%; IAPC) e GIC (25%; IAH) do que em GIA (0%; IACU) utilizando 20×10^6 espermatozóides móveis. A mesma diferença numérica foi observada com a média de espermatozóides encontrados por oviduto, considerando todos os ovidutos lavados, reforçando a hipótese de que a deposição de 20×10^6

de espermatozóides, oriundos de sêmen congelado, no corpo do útero, não é eficiente, pois um número insuficiente de espermatozóides atinge o oviduto.

Após as inseminações com sêmen fresco do garanhão B, foram encontrados espermatozóides no oviduto de 2 éguas inseminadas na extremidade do corno uterino (40%; GIIB; 20×10^6 ; Tabela 16) e de 2 éguas inseminadas por histeroscopia (50%; GIIC; 20×10^6 ; Tabela 17). Porém, quando as éguas foram inseminadas no corpo do útero (GIIA; 20×10^6) não foram encontrados espermatozóides nos ovidutos das éguas o que demonstra novamente que a inseminação artificial na extremidade do corno uterino e a inseminação histeroscópica são mais eficientes do que a inseminação artificial no corpo do útero, quando utiliza-se um baixo número de espermatozóides oriundos de sêmen fresco de garanhão, como observado na parte I deste experimento, onde foi utilizado uma baixa dose de sêmen congelado do garanhão A. Rigby et al. (2000) obtiveram resultado semelhante a este, onde observaram que a deposição do sêmen na extremidade do corno uterino, resultou em uma maior proporção de espermatozóides recuperados do oviduto, do que quando os espermatozóides foram depositados no corpo do útero.

Após a lavagem dos ovidutos das éguas do grupo GIIE, as quais foram inseminadas com 100×10^6 espermatozóides oriundos de sêmen fresco do garanhão B, através da inseminação intraperitoneal, não foi encontrado espermatozóide em nenhum oviduto, o que sugere que os espermatozóides não penetram no oviduto das éguas através da fímbria após a inseminação intraperitoneal.

O número de espermatozóides encontrados nos ovidutos e o número de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides, após as inseminações com 500×10^6 no corpo do útero (GIID), comparados com os resultados de GIIA (IACU; 20×10^6), mostra que 20×10^6 espermatozóides (sêmen fresco; garanhão B) quando aplicados no corpo do útero, não foram suficientes para atingir o oviduto, reforçando a idéia de se faz necessário a utilização de outras técnicas como a IAPC ou IAH, para que um maior número de espermatozóides atinja o oviduto, quando utiliza-se um baixo número de espermatozóides. Este fato também foi observado na parte I deste experimento, quando foi utilizado sêmen congelado do garanhão A.

Observou-se que a porcentagem de ovidutos em que foram encontrados espermatozóides de GIIA (sêmen fresco; 20×10^6 ; IACU) foi significativamente igual a de GIIB (sêmen fresco; 20×10^6 ; IAPC), a despeito da diferença numérica. Porém, esta porcentagem foi significativamente inferior quando comparado com GIIC (sêmen fresco; 20×10^6 ; IAH) e GIID (sêmen fresco; 500×10^6 ; IACU), mostrando mais uma vez que é

necessário um maior número de espermatozóides para a realização de inseminação no corpo do útero. Entretanto, a média de espermatozóides encontrados por oviduto de GIID (7750) foi significativamente maior do que os demais grupos.

Não foi encontrado espermatozóide nos ovidutos das éguas em nenhum dos grupos GIIIA (20×10^6 ; IACU), GIIIB (20×10^6 ; IAPC), GIIIC (20×10^6 ; IAH) e GIID (500×10^6 ; IACU), em que utilizou-se sêmen congelado do garanhão B, embora o sêmen apresentasse boa qualidade após a descongelação, mostrando que a diferença no transporte espermático não ocorre somente entre sêmen fresco e congelado, mas também entre sêmen congelado de diferentes garanhões, fato este que pode ser concluído quando compara-se os resultados obtidos com o uso do sêmen congelado do garanhão A com o garanhão B (tabela 22). Estes resultados podem explicar os baixos índices de fertilidade obtidos com a aplicação do sêmen congelado de alguns garanhões, mesmo quando os mesmos apresentam boa qualidade de sêmen depois de descongelado.

Baseados nos resultados deste trabalho, pode-se afirmar que no caso específico do garanhão B, o fator motilidade não foi determinante para a obtenção de uma reduzida população espermática no oviduto, bem como, o sítio de deposição do sêmen no momento da inseminação, pois não foi encontrado espermatozóide nos ovidutos, em nenhuma das técnicas utilizadas, indicando que outros fatores devem estar envolvidos neste processo.

Alguns autores citam que a motilidade do sêmen pode não ser tão importante para o transporte espermático pelo útero, pois devido a um aumento nas contrações uterinas após a inseminação, o sêmen se espalha rapidamente pelo útero (Hunter, 1999). Entretanto, Parker et al. (1975) demonstraram que a motilidade é importante para o transporte dos espermatozóides na junção útero-tubárica e nos ovidutos.

A comparação dos resultados obtidos nos grupos em que foi utilizado sêmen fresco do garanhão B, com os resultados dos grupos em que utilizou-se sêmen congelado do mesmo garanhão, indica que a migração espermática possa ser diferente entre o sêmen fresco e o congelado, concordando com os resultados de Scott et al. (1995), que também afirmam que a migração dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino é melhor quando se utiliza sêmen fresco, bem como, também foi observado por Bader (1982), o qual observou que a habilidade dos espermatozóides provenientes de sêmen congelado de atingirem a região da ampola é menor do que a do sêmen fresco. Acredita-se que a diferença na capacidade de migrar até o oviduto, entre sêmen fresco e congelado ocorra em consequência de alterações

bioquímicas na membrana plasmática dos espermatozóides ou devido à retirada do plasma seminal antes do processo de criopreservação (Clavert et al., 1985).

Além do transporte espermático do sêmen congelado de garanhões ser deficiente em relação ao sêmen fresco, como observado neste trabalho, também já foi demonstrado que espermatozóides oriundos de sêmen congelado, não tem a mesma capacidade de interação com as células epiteliais do oviduto como os espermatozóides oriundos de sêmen fresco (Dobrinski et al., 1995).

A média de espermatozóides encontrados no oviduto das éguas, 12 horas após a inseminação convencional com 500×10^6 espermatozóides móveis, oriundos do sêmen fresco do garanhão B (7750), foi semelhante ao número de espermatozóides encontrado por Parker et al. (1975) que encontraram 6000 espermatozóides por oviduto, 12 horas após a inseminação. Entretanto, quando foi utilizado 500×10^6 espermatozóides oriundos de sêmen congelado, tanto do garanhão A quanto do garanhão B, em inseminações com dose convencional, realizadas no corpo do útero, foi encontrado um menor número de espermatozóides nos ovidutos das éguas. Reforçando a idéia de que o sêmen congelado apresenta uma deficiência na capacidade de migração no trato reprodutivo da fêmea.

Já foi demonstrado em humanos e eqüinos que o líquido folicular exerce uma atração quimiotática dos espermatozóides ao corno ipsilateral ao ovário que ocorreu ou vai ocorrer a ovulação (Villanueva et al., 1990; Navarro et al., 1998). Entretanto, não foi observado diferença na migração dos espermatozóides entre os cornos uterinos após as inseminações realizadas no corpo do útero (GID – 500×10^6 espermatozóides, sêmen congelado; GIID – 500×10^6 espermatozóides, sêmen fresco), provavelmente pelo fato de ter sido utilizado apenas éguas em anestro para a realização de todas as inseminações deste experimento.

Embora saibamos que a migração e interação dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino, ocorra em conseqüência de variações endocrinológicas das fêmeas e que o transporte espermático é mais eficiente quando as fêmeas se encontram no estro, como já foi demonstrado em ratas por Orihuela et al. (1999) e que a interação dos espermatozóides com as células do oviduto também é mais eficiente sob condições hormonais semelhantes às condições do período do estro em eqüinos (Thomas et al., 1994a). Portanto, no experimento 2 foram utilizadas éguas em anestro para a realização de todas as inseminações, com objetivo de melhor padronizar a fase do ciclo para todos os animais, evitando assim diferenças entre os grupos, decorrentes da fase do ciclo.

Através dos resultados obtidos observa-se que a interação sêmen-útero é diferente quando se utiliza diferentes técnicas de inseminações, diferentes doses inseminantes, bem

como, quando se utiliza sêmen fresco e congelado de garanhões, concordando com as observações de Katila (2001)

5.3. Teste de fertilidade entre diferentes técnicas de inseminação artificial utilizando um baixo número de espermatozóides.

Para avaliação da eficiência de diferentes técnicas de inseminação, utilizando baixa dose de sêmen congelado de garanhões, foi desenvolvido o experimento 3, o qual comparou a fertilidade de grupos de éguas inseminadas com 20×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero (sêmen congelado; IACU; GI), com 20×10^6 espermatozóides móveis na extremidade do corno uterino (sêmen congelado; IAPC; GII), com 20×10^6 espermatozóides móveis por histeroscopia, sobre a papila (sêmen congelado; IAH; GIII), com 20×10^6 espermatozóides móveis por inseminação intrafolicular (sêmen congelado; IAIF; GIV) e com 100×10^6 espermatozóides móveis por inseminação intraperitoneal (sêmen fresco; IAIP; GV). Não tendo sido observada nenhuma prenhez nos grupos em que as éguas foram inseminadas através de inseminação intrafolicular e intraperitoneal. Observou-se que as taxas de prenhez de GI, GII e GIII foram respectivamente de 15%, 40% e 45%, não havendo diferença significativa entre estes grupos. A porcentagem de prenhez de GI, também foi significativamente igual à dos grupos GIV e GV. Porém, as porcentagens de prenhez de GIV e GV foram significativamente inferiores às de GII e GIII.

Ao avaliar os resultados de fertilidade, quando do uso de sêmen congelado do garanhão A, verifica-se que as taxas de prenhez de GII (40%; IAPC; 20×10^6) e GIII (45%; IAH; 20×10^6) foram numericamente superiores do que a taxa de prenhez de GI (15%; 20×10^6 ; IACU). A despeito de não existir uma diferença estatística, este resultado é reforçado pelos resultados obtidos no experimento 2, onde foi observado uma superioridade numérica na média de espermatozóides encontrados por oviduto, quando do uso da técnica de IAPC e IAH, o que está de acordo com a hipótese de Brinsko et al. (1991), pois estes autores acreditam que o aumento do número de espermatozóides no oviduto de éguas pode melhorar as taxas de fertilidade e a deposição do sêmen mais próximo da junção útero-tubárica, pode levar a um aumento da população espermática no oviduto e conseqüentemente melhorar a fertilidade.

Os índices de fertilidade satisfatórios que obtidos com as técnicas de inseminação histeroscópica, em que o sêmen foi depositado sobre a papila e inseminação na extremidade do corno uterino, as quais a deposição do sêmen é realizada mais próximo do sítio de

fertilização, podem ser atribuídos ao fato de que com a aplicação destas técnicas, a fase de seleção espermática que ocorre durante o transporte uterino (Hunter et al., 1991) seja ultrapassada.

Ao analisar os resultados de prenhez obtidos por Leão et al (2002), juntamente com os resultados obtidos no experimento 2 deste trabalho, utilizando sêmen fresco, pode ser observada uma relação entre estes resultados. Quando foi utilizado neste trabalho, uma baixa dose inseminante no corpo do útero, não foi recuperado espermatozóide, indicando uma pequena população espermática nos ovidutos, nestas mesmas condições Leão et al. (2002) obtiveram uma baixa porcentagem de prenhez (16,67%). Ao utilizar uma dose inseminante reduzida com histeroscopia, foram recuperados 1875 espermatozóides por oviduto, sendo detectado uma taxa de prenhez de 41,67% quando Leão et al. (2002) utilizaram esta técnica, também com baixa dose. Quando foi utilizado dose convencional, para realização das inseminações no corpo do útero, foi recuperado um alto número de espermatozóides por oviduto (7750) e no teste de fertilidade estes autores conseguiram uma taxa de prenhez de 50%. Ao analisar concomitantemente os resultados obtidos na inseminação no corpo do útero com dose convencional, poderia esperar uma melhor porcentagem de prenhez, devido ao alto número de espermatozóides recuperados dos ovidutos nestas condições. Porém, esta diferença pode ser explicada pelo fato de Leão et al. (2002) terem utilizado um garanhão de baixa fertilidade e de acordo com Scott et al. (1995) o transporte dos espermatozóides pelo útero é diferente entre o sêmen de garanhões férteis e subférteis. Estes resultados mostram ainda a eficiência da IAH na obtenção de prenhez, utilizando baixa dose de sêmen congelado de garanhões subférteis, pois no momento da IAH a fase de transporte espermático no útero é ultrapassada.

O resultado de fertilidade (45%) obtido com a inseminação histeroscópica foi inferior ao resultado de Morris et al. (2000a), que obtiveram 60% de prenhez em éguas, utilizando 10×10^6 espermatozóides, porém, estes pesquisadores utilizaram sêmen fresco. Entretanto, Vazquez et al. (1998), mesmo utilizando sêmen fresco obtiveram uma taxa de prenhez de 30% realizando as inseminações com $3,8 \times 10^6$ espermatozóides oriundos de sêmen fresco de garanhões.

Muitos autores acreditam que a inseminação histeroscópica é uma técnica que pode ser utilizada para minimizar a resposta inflamatória pós-cobertura, vindo a solucionar o problema de éguas que desenvolvem uma endometrite severa e persistente após a inseminação convencional (Lindsey et al., 2001), por permitir o uso de um número reduzido de espermatozóides (Morris et al., 2000b). Concordando com estes autores, Gomes (2002)

observou que a resposta inflamatória causada pela inseminação histeroscópica com baixa dose de sêmen congelado é menor do que a resposta inflamatória causada pela inseminação convencional com 800×10^6 espermatozoides oriundos de sêmen congelado de garanhões.

No grupo em que as éguas foram inseminadas na extremidade do corno uterino, foi obtido uma taxa de prenhez de 40%, semelhante ao resultado de Nie et al. (2003) que obtiveram uma taxa de prenhez de 33% utilizando 25×10^6 espermatozoides nas inseminações na ponta do corno uterino de éguas. Entretanto, o resultado deste trabalho foi inferior a taxa de gestação obtida por Buchanan et al. (1999), que foi de 57%, utilizando 25×10^6 espermatozoides, porém utilizando sêmen fresco de garanhões.

A taxa de prenhez obtida, com a inseminação no corpo do útero, utilizando 20×10^6 espermatozoides oriundos de sêmen congelado (15%; GI) foi semelhante ao resultado de Dell'Aqua Junior (2000) que utilizando sêmen congelado de garanhão, conseguiu 20% de prenhez realizando as inseminações com 50×10^6 espermatozoides no corpo do útero.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que tanto a inseminação histeroscópica, quanto a inseminação na extremidade do corno uterino são eficientes na obtenção de prenhez, quando se utiliza um baixo número de espermatozoides, discordando dos resultados de Lindsey et al. (2000), que conseguiram 50% de prenhez com a deposição de 5×10^6 espermatozoides sobre a junção útero-tubárica de éguas (histeroscopia) e não obtiveram prenhez com a deposição do sêmen na ponta do corno através de desvio de pipeta. Talvez o número de espermatozoides seja o ponto determinante desta diferença e a IAH seja mais indicada para a aplicação de um número muito reduzido de espermatozoides. Dell'Aqua Junior (2000) também não observou diferença significativa entre a deposição de sêmen no corpo do útero (20%) e extremidade do corno (zero%) utilizando 50×10^6 espermatozoides oriundos de sêmen congelado de garanhões.

Lyndsey et al. (2005) observaram uma diferença numérica na porcentagem de prenhez, utilizando 20×10^6 espermatozoides oriundos de sêmen de garanhões sexado, após 18 horas de refrigeração a 5°C , entre as técnicas de inseminação histeroscópica (55%) e na extremidade do corno uterino (38%), acreditando estes autores que a diferença numérica observada possa ser decorrente de uma maior irritação do endométrio causada pelo desvio da pipeta do que a irritação causada pelo endoscópio. Entretanto, Güvenc et al. (2005) avaliaram a resposta inflamatória do útero de éguas após as inseminações e mostraram que a inseminação na extremidade do corno, com baixa dose inseminate, realizada através de desvio de pipeta, não causa uma irritação significativa quando comparada com a inseminação convencional.

O resultados não mostraram diferença na eficiência das técnicas de inseminação IAH e IAPC, utilizando 20×10^6 espermatozoides oriundos de sêmen congelado. O mesmo foi constatado por Brinsko et al. (2003) e Rigby et al. (2001), utilizando 5×10^6 espermatozoides oriundos de sêmen refrigerado de garanhões, que assim como nós, observaram apenas uma pequena diferença numérica na porcentagem de prenhez entre IAH e IAPC, sendo a porcentagem um pouco maior com a utilização da IAH. Entretanto, Squires et al. (2000) observaram uma vantagem significativa na utilização da IAH (50%) em relação a IAPC (zero%).

Alguns trabalhos demonstram que melhores índices de prenhez em éguas, são obtidos, quando as inseminações as quais os espermatozoides são depositados próximo ao sítio de fertilização, são realizadas com um baixo volume de sêmen, como foi observado por Buchanan et al. (1999) que obtiveram resultado de fertilidade um pouco melhor, quando realizaram a inseminação na ponta do corno com 5×10^6 espermatozoides em 0,2 ml (40%) do que com 5×10^6 espermatozoides em 1,0 ml (30%). Morris et al. (2000b) também obtiveram taxa de prenhez numericamente melhor, quando realizaram inseminações histeroscópicas com sêmen congelado, utilizando 5×10^6 espermatozoides em 100 μ L (79%) do que em 500 μ L (64%). Sendo o resultado de prenhez com IAPC (40%), deste trabalho, igual ao resultado obtido por Buchanan et al. (2000), mesmo utilizando um maior número de espermatozoides, bem como, o resultado de prenhez obtido com IAH (45%) foi muito inferior ao resultado obtido por Morris et al. (2000b) utilizando apenas 5×10^6 espermatozoides. Talvez o volume de sêmen utilizado para a realização das inseminações (0,5 mL) possa explicar em parte estas diferenças.

De acordo com Seidel et al. (2000) e Senger et al. (1998), a deposição do sêmen próximo ao sítio de fertilização também mostrou-se eficiente em vacas, permitindo a aplicação de um baixo número de espermatozoides e obtenção de bons índices de fertilidade. Entretanto, McKenna et al. (1990) e Hylan et al. (2002), não constataram vantagens em depositar o sêmen na extremidade do corno uterino de vacas.

Kurykin et al. (2003), observaram que a aproximação dos espermatozoides ao sítio de fertilização, no momento da inseminação, utilizando uma baixa dose de sêmen, não foi tão eficiente quanto a inseminação convencional com 40×10^6 espermatozoides em novilhas sincronizadas, bem como, Andersson et al. (2004), também observaram que as inseminações com baixa dose resultaram em taxas de prenhez inferiores, quando comparadas com o uso da dose convencional, sendo que o local de deposição do sêmen não influenciou nas taxas de gestação de vacas leiteiras.

Diferente do que se observa com bovinos, onde existe uma grande controvérsia na vantagem ou não, de se utilizar técnicas de inseminação, que aproximam os espermatozóides do sítio de fertilização, em suínos a maioria dos trabalhos relatam melhora na fertilidade utilizando técnicas de inseminação em que o sêmen é depositado próximo ao sítio de fertilização, mesmo quando da utilização de uma baixa dose inseminate (Rath et al., 2000; Roca et al., 2002; Wolken et al., 2002).

Baseados na hipótese de que o sêmen depositado sobre o ovário poderia migrar, através da fímbria, para o oviduto, como foi demonstrado por Lopez-Gatius & Yániz (2000) em vacas, decidiu-se realizar a avaliação da eficiência da técnica de inseminação intraperitoneal em éguas, primeiramente com sêmen fresco, para depois ser avaliado a sua eficiência com a aplicação de uma baixa dose de sêmen congelado. Foi decidido realizar as inseminações intraperitoneais com um maior número de espermatozóides oriundos de sêmen fresco, em sendo positivo os resultados, seria realizado um teste de fertilidade utilizando sêmen congelado. Esta decisão foi tomada em decorrência da necessidade de se eliminar o fator “sêmen congelado”, onde a fertilidade é sabidamente variável. Coutinho da Silva et al. (2004), constataram que a taxa de prenhez em éguas é significativamente menor quando se realiza a inseminação no oviduto com sêmen congelado, quando comparada com sêmen fresco. Não foi observada prenhez com a utilização da inseminação intraperitoneal (IAIP) em éguas com 100×10^6 espermatozóides oriundos de sêmen fresco.

Quando foram lavados os ovidutos das éguas inseminadas por inseminação artificial intraperitoneal, não foi recuperado espermatozóide em nenhum oviduto. Entretanto, Mroueh et al. (1966) recuperaram espermatozóides do oviduto de coelhas após a IAIP. Vanden Boch et al. (1974), também recuperaram espermatozóides nos ovidutos de coelhas após a IAIP com 200×10^6 espermatozóides de sêmen de boa qualidade.

Van Pelt (1970), mostrou que a técnica de IAIP é eficiente em primatas e é uma técnica utilizada na medicina humana para o tratamento de casais com problemas de fertilidade (Hovatta et al., 1990; Evans et al., 1991).

Uma das preocupações com a realização da IAIP é a reação inflamatória que esta técnica poderia causar na cavidade abdominal, pelo fato do sêmen ser depositado nesta cavidade sobre o ovário, bem como o desenvolvimento de uma resposta imune, levando a uma produção de anticorpos contra espermatozóides, como já foi demonstrado em humanos por Critser et al. (1989), Livi et al. (1990) e Crosignani et al. (1991).

Como a maioria das mulheres que são inseminadas por IAIP, associam um tratamento superovulatório à aplicação desta técnica, fica difícil estabelecer qual a

responsabilidade de cada biotecnologia utilizada, na obtenção da gestação. Porém, Ragni et al. (1990) obtiveram gestação em uma mulher, após a IAIP em ciclo não superovulado.

Foi demonstrado por Hovatta et al. (1990) e Turhan et al. (1992) que a IAIP tem um resultado favorável para solucionar problemas de fertilidade em humanos, contradizendo os resultados de Campos-Liete et al. (1992), que não constataram efeito benéfico da utilização da IAIP, bem como Tiemessen et al. (1997) que observaram que a inseminação intrauterina foi mais eficiente no tratamento de casais com problemas de fertilidade.

Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, López-Gatius (1995) conseguiram prenhez em vacas através da IAIP. Ao realizar um teste de fertilidade em vacas com problemas reprodutivos, este autor não observou diferença entre o tratamento realizado com inseminação intra-uterina (20,6%) e o tratamento com IAIP (14,6%).

López-Gatius & Yániz (2000) demonstraram que em vacas existe um transporte espermático passivo da cavidade abdominal para o trato genital feminino, sendo encontrados espermatozóides até mesmo no muco cervical após a IAIP.

Conforme Yániz et al. (2002) o momento ideal para realizar a IAIP varia entre as espécies de acordo com a capacitação, transporte espermático e momento da ovulação. Portanto, foi decidido que as IAIP seriam realizadas muito próximo da ovulação (pré-ovulação), quando o folículo apresentava alta flutuação e uma imagem ultra-sonográfica condizente à imagem de um folículo próximo da ovulação, quando o mesmo perde a forma arredondada, com intuito de facilitar a penetração dos espermatozóides no oviduto através da fímbria.

Como não foi observado prenhez após as inseminações intraperitoneais com sêmen fresco e não foi detectado a presença de espermatozóides no lavado do oviduto das éguas inseminadas por inseminação intraperitoneal (no experimento 2), acredita-se que os espermatozóides não penetram no oviduto após a IAIP e este fato pode ser decorrente da posição anatômica da fímbria, sobre a fossa de ovulação, no momento em que foram realizadas as inseminações, que foram bem próximas da ovulação.

Embora não tenha sido obtido prenhez após as IAIP, esta técnica é segura e de fácil aplicação no campo. Porém, mais estudos se fazem necessários para determinar quais os fatores responsáveis pelo insucesso desta técnica em eqüinos.

Em humanos a inseminação artificial intrafolicular (IAIF) também é uma técnica utilizada para o tratamento de casais com problemas de fertilidade (Lucena et al., 1991). Porém, não existe relatos de obtenção de prenhez em éguas com a utilização desta técnica. Portanto, foi decidido avaliar a eficiência desta técnica, utilizando baixa dose de sêmen

congelado de garanhões, baseado na hipótese que os espermatozóides depositados dentro do folículo poderiam migrar para o oviduto no momento da ovulação.

Antes de iniciar o teste de fertilidade da IAIF, foi desenvolvido o experimento 1 deste trabalho, para avaliar a viabilidade do sêmen congelado de garanhões após a diluição em fluido folicular. Depois de constatado que até três horas após a diluição, o fluido folicular não exercia efeitos deletérios sobre a viabilidade espermática, determinou-se a realização do teste de fertilidade com a IAIF, em que as inseminações eram realizadas o mais próximo possível da ovulação, pois em uma fase pré-experimental, onde foram realizados treinamentos técnicos, observou-se que quando as éguas eram inseminadas por IAIF, muito tempo antes da ovulação, 24 horas após a aplicação de hCG, a IAIF induzia a luteinização do folículo, não ocorrendo ovulação.

Não foi observado prenhez no grupo em que as éguas foram inseminadas por IAIF, resultado igual ao de Meinjtes et al. (2001), que também não conseguiram prenhez inseminado éguas com IAIF. Entretanto, Zbella et al. (1992) obtiveram gestação em uma mulher com o uso da IAIF no tratamento de um casal com problemas de fertilidade de origem masculina. Contudo, de acordo com Nuojuu-Huttunen et al. (1995) a IAIF mostrou-se ineficiente para o tratamento de casais com problemas de fertilidade quando comparada com outras técnicas. De acordo com Yao et al. (1996), o hFF inibe a ligação dos espermatozóides com a zona pelúcida e este pode ser um dos fatores envolvidos no insucesso da técnica de IAIF.

Quando foram realizadas inseminações intrafoliculares *in vitro*, em folículos pré ovulatórios recuperados no abatedouro, para avaliação da taxa de recuperação de espermatozóides três horas após a deposição do sêmen no interior do folículo, observou-se que através do orifício formado pela agulha no momento da inseminação ocorre um grande extravasamento de líquido folicular em um período de três horas e com isto acredita-se que ocorra uma perda de espermatozóides na cavidade peritoneal, reduzindo o número de espermatozóides dentro do folículo. Quando recuperou-se o fluido folicular que persistiu dentro do folículo três horas após a inseminação, foi observado que o volume de líquido que permaneceu dentro do folículo era muito inferior ao esperado e a taxa de recuperação de espermatozóides foi de apenas 24,13%. Estes resultados podem, em parte, explicar o baixo resultado obtido *in vivo*, com a utilização da inseminação artificial intrafolicular, em consequência da presença de um número reduzido de espermatozóides disponíveis para fertilização.

O volume de líquido folicular em um folículo pré ovulatório de éguas é de aproximadamente 50 mL e apenas uma pequena porcentagem deste volume penetra na tuba uterina após a ovulação, sendo o restante liberado na cavidade abdominal, como demonstrado por Nambo et al. (2002). Como grande parte do líquido folicular é liberado na cavidade abdominal, após a ovulação, grande parte dos espermatozóides depositados no folículo pré-ovulatório de éguas, após a inseminação artificial intrafolicular também é perdido na cavidade abdominal, diminuindo assim o número de espermatozóides disponíveis para a fertilização no oviduto, após a ovulação.

A utilização de um elevado número de espermatozóides para a realização da IAIF, poderia contornar um dos fatores que pode estar envolvido no insucesso desta técnica, que é a presença de um número insuficiente de espermatozóides no oviduto após a ovulação das éguas inseminadas por IAIF, em conseqüência da perda de fluido folicular e sêmen, para cavidade peritoneal, através do orifício formado na parede do folículo no momento da inseminação, bem como a liberação de fluido folicular e sêmen nesta cavidade no momento da ovulação.

Com intuito de esclarecer o motivo do insucesso da IAIF, foi realizado o experimento 5, onde avaliou-se o efeito da presença de espermatozóides dentro do folículo sobre a fertilidade de éguas inseminadas convencionalmente com sêmen fresco. Observou-se que as éguas que foram inseminadas concomitantemente com 20×10^6 espermatozóides por IAIF e com 500×10^6 espermatozóides no corpo do útero apresentaram uma taxa de prenhez de 50%, mostrando que a presença dos espermatozóides no folículo não inviabiliza o oócito. Entretanto, a porcentagem de prenhez do grupo controle, em que as éguas foram inseminadas somente com 500×10^6 espermatozóides no corpo do útero, foi de 83,33%.

Embora não tenhamos observado diferença estatística entre os grupos, existiu uma diferença numérica evidente entre a porcentagem de prenhez do grupo controle e do grupo em que realizou-se IAIF e IACU ao mesmo tempo. Este resultado sugere que apesar da presença de espermatozóides no folículo não inviabilizarem o oócito, algum fator interferiu quando da utilização da IAIF levando a uma redução na fertilidade. Os resultados deste experimento estão, em parte, de acordo com os resultados obtidos por Eilts et al. (2002), que observaram que a IAIF interferiu negativamente no estabelecimento de prenhez em éguas e estes autores acreditam que algum componente da célula espermática inibe a ovulação ou maturação normal do oócito.

Com objetivo de elucidar o motivo do insucesso da IAIF em eqüinos, Parlevliet et al. (2004) desenvolveram um experimento onde avaliaram a porcentagem de recuperação de

espermatozóides, aspirando os folículos 4 horas após a IAIF e avaliaram também neste trabalho a viabilidade dos espermatozóides recuperados. A taxa de recuperação de espermatozóides foi muito baixa, sendo de 0,53% para as inseminações com 50×10^6 espermatozóides e de 9,02% para as inseminações com 500×10^6 espermatozóides, semelhante ao resultado que obtivemos quando avaliamos *in vitro*, a recuperação de espermatozóides de folículos inseminados. De nove amostras avaliadas estes autores encontraram espermatozóides vivos em apenas 5 amostras e concluíram que o ambiente intrafolicular é desfavorável para a viabilidade espermática.

Embora não tenha sido obtido prenhez após a IAIF, esta técnica é segura e de fácil aplicação no campo. Porém, mais estudos se fazem necessários para determinar os motivos do insucesso desta técnica que ainda não estão bem esclarecidos, mas acredita-se que se deve a uma interação de vários fatores como a perda de espermatozóides na cavidade peritoneal através do orifício realizado na parede do folículo durante a inseminação, a perda de espermatozóides na cavidade peritoneal, juntamente com grande parte do fluido folicular no momento da ovulação e um efeito deletério da presença de espermatozóides no folículo sobre a viabilidade do oócito.

Como na inseminação intraperitoneal, uma grande preocupação na realização da inseminação intrafolicular é a reação inflamatória que estas técnicas poderiam causar na cavidade peritoneal, pois com a aplicação destas técnicas são depositados, na cavidade peritoneal, espermatozóides, componentes do meio diluente e até mesmo bactérias. Devido a esta preocupação, foram realizadas análises laboratoriais do líquido peritoneal de éguas que foram inseminadas por IAIP e IAIF, antes e 6 horas após as inseminações, com objetivo de avaliar se as mesmas causariam uma resposta inflamatória na cavidade peritoneal, com comprometimento da saúde animal.

Ao avaliar a resposta inflamatória após a IAIP, observou-se que esta técnica de inseminação causa uma resposta inflamatória leve a moderada, onde de todos os parâmetros avaliados na análise do líquido peritoneal, somente a porcentagem de linfócitos e eosinófilos, a concentração de glicose e a presença de sangue não diferiram estatisticamente entre as amostras coletadas antes e 6 horas após as inseminações.

Constatou-se que a IAIF também causa uma reação inflamatória leve na cavidade peritoneal e este fato reforça a hipótese da presença de sêmen nesta cavidade após a IAIF, podendo este fato ser decorrente do extravasamento de fluido folicular através do orifício formado na parede do folículo ou até mesmo no momento da ovulação.

Ao comparar as amostras coletadas 6 horas após as inseminações intrafoliculares com as amostras coletadas 6 horas após as inseminações intrafoliculares, não foi observado diferença estatística entre as técnicas de inseminação utilizadas, em nenhum dos parâmetros avaliados, mostrando que a intensidade de reação inflamatória causada na cavidade peritoneal é semelhante entre as técnicas e não causa prejuízos para a saúde animal, pois nenhuma égua apresentou alterações clínicas compatíveis com peritonite, o que indica ser leve e passageiro o processo inflamatório.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, nos permitiram concluir que:

1. O fluido folicular não induz alterações na estrutura e função dos espermatozóides oriundos de sêmen congelado de eqüinos.
2. As técnicas de inseminação na extremidade do corno uterino e histeroscópica, mostraram-se mais eficientes do que a inseminação no corpo do útero, com a utilização de um número reduzido de espermatozóides de garanhões, demonstrando que as técnicas em que os espermatozóides são depositados mais próximo do sítio de fertilização, são adequadas.
3. A população de espermatozóides encontrada nos ovidutos das éguas inseminadas no corpo do útero, com 500×10^6 espermatozóides móveis oriundos de sêmen congelado, é semelhante à população espermática dos ovidutos das éguas inseminadas na extremidade do corno uterino e por histeroscopia, utilizando apenas 20×10^6 espermatozóides móveis oriundos de sêmen criopreservado.
4. A habilidade de atingir o oviduto varia entre sêmen fresco e congelado do mesmo indivíduo e também entre sêmen congelado de diferentes garanhões.
5. O fato de não termos encontrado espermatozóides nos ovidutos de éguas inseminadas através de inseminação intraperitoneal, associado à não obtenção de prenhez, demonstram claramente que os espermatozóides não estão atingindo o oviduto após a utilização desta técnica.

6. A técnica de inseminação intrafolicular não foi eficiente na obtenção de fertilização, podendo este fato ser explicado pela redução do número de espermatozóides disponíveis para fertilização, devido ao extravasamento de fluido folicular, através do orifício causado na parede do folículo no momento da inseminação intrafolicular e um possível efeito da presença de espermatozóides dentro do folículo pré-ovulatório, sobre a viabilidade do oócito.

7. As técnicas de inseminação intraperitoneal e inseminação intrafolicular causam uma leve reação inflamatória na cavidade peritoneal. Entretanto, estas técnicas são seguras e de fácil aplicação no campo. Devido ao insucesso das mesmas, mais estudos se fazem necessários para determinar os fatores responsáveis por este insucesso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.E. Intraperitoneal insemination in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, v.18, p.333-39, 1969.
- ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H.G., SHAND, N., EVANS, M.J. Is LH secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin and factors affecting secretion in the oestrous mare. *Biol. Reprod. Monograph Series*, v.1, p.361-371, 1995.
- ANDERSSON, M., TAPONEN, J., KOSKINEN, E., DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, v.61, p.1583-88, 2004.
- ARNS, M.J., WEEB, G.W., JOHNSON, L. Zona pellucida-induced acrossome reactions in equine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.44, p.738, 1991. (Supplement)
- BACH, L.G., RICKETTS, S.W. Paracentesis as an aid to the diagnosis of abdominal disease in the horse. *Equine Vet. J.*, v. 6, p. 116-121, 1985.
- BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J. Reprod. Fertil.*, v.32, p.59-64, 1982.
- BEHRRENS, E., PARRAGA, M.E., NASSIFF, A., DELMAR, N. Reference values of peritoneal fluid from health foals. *J. Equine Vet. Sci.*, v.10, p.348-52, 1990.
- BOGH, I.B., HOIER, R., SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Steroid concentration in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. *Theriogenology*, v.54, p.877-88, 2000.
- BRINSKO, S.P., RIGBY, S.L., LINDSEY, A.C., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.C., VARNER, D.D. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*, v.59, p.1001-9, 2003.
- BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. The effect of uterine lavage performed four h post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*, v.35, p.1111-9, 1991.
- BROWNLOW, M.A. Polymorphonuclear neutrophil leucocytes of peritoneal fluid. *Equine Vet. J.*, v.15, p.22-4, 1983.
- BROWNLOW, M.A., HUTCHINS, D.R., JOHNSTON, K.G. Reference values for equine peritoneal fluid. *Equine Vet. J.*, v.13, p.127-130, 1981.

- BUCHANAN, B.R., McCUE, P.M., SQUIRES, E.L., SEIDEL JUNIOR, G.E., FLEURY, J.J. Pregnancy rates in mares following a single insemination with a low number of spermatozoa into the tip of the uterine horn. *Theriogenology*, v.51, p.395, 1999.
- BUCHANAN, B.R., SEIDEL Jr., G.E., McCUE, P.M., SCHENK, J.L., HENRICKHOFF, L.A., SQUIRES, E.L. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1333-44, 2000.
- BURRELLO, N., VICARI, E., D'AMICO, L., SATTA, A., D'AGATA, R., CALOGERO, A.E. human follicular fluid stimulates the sperm acrossome reaction by interacting with the γ -aminobutyric acid receptors. *Fertil. Steril.*, v.82, p.1086-90, 2004.
- CAMPOS-LIETE, E., INSULL, M., KENNEDY, S.H., ELLIS, J.D., SARGENT, I., BARLOW, D.H. A controlled assessment of direct intraperitoneal insemination. *Fertil. Steril.*, v.57, p.168-73, 1992.
- CARNEVALE, E.M., ALVARENGA, M.A., SQUIRES, E.L., CHOIY, H. Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1999, Nashville. *Proceedings...* Nashville, 1999. p.44.
- CLAVERT, A., GABRIEL-ROBEZ, O., MONTAGNON, D. Physiological role of the semen vesicle. *Prog. Biol. Med.*, v.12, p.80-94, 1985.
- CONNALLY, H.E. Cytology and fluid analysis of the acute abdomen. *Clinical Thechniques in Small Animal Practice*, v.18, p.39-44, 2003.
- COUTINHO DA SILVA, M.A., CARNEVALE, E.M., MACLELLAN, L.J., PREIS, K.A., SEIDEL Jr, G.E., Squires, e.l. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v.61, p.705-13, 2004.
- COUTINHO DA SILVA, M.A., CARNEVALE, E.M., MACLELLAN, L.J., PREIS, K.A., SQUIRES, E.L. Comparison of oocyte transfer using intrauterine or intraoviductal insemination in mares. *Theriogenology*, v.55, p.359, 2001.
- CRITSER, J.K., CRITSER, E.S., VILLINES, P., CUOLAM, C.B. Sperm antibodies after intraperitoneal insemination of sperm. In: 6TH WORLD CONGRESS IN VITRO FERTILIZATION, 1989, Israel. *Proceedins...* Israrel, 1989. P.58.
- CROSIGNANI, P.G., De LAURETIS, L., RAGNI, G., OLIVARES, M., FINZI, G.C., PEROTTI, L. Intraperitoneal insemination in the treatment of male and unexplained infertility. *Fertil. Steril.*, v.55, p.333-37, 1991.

DALTON, J.C., NADIR, S., BAME, J.H., SAACKKE, R.G. Effect of deep uterine insemination on spermatozoa accessibility to the ovum in cattle: a competitive insemination study. *Theriogenology*, v.51, p.883-90, 1999.

DEHEER, H.L., PARRY, B.W., GRINDEM, C.B. Peritoneal Fluid. In: COWELL, R.L., TYLER, R.D. Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse. Second Edition. St. Louis: Copyright, 2002. p.127-62.

DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino. Botucatu, 2001. 81p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

DOBRINSKI, I., THOMAS, P.G.A., BALL, B.A. Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae *in vitro*. *J. Androl.*, v.16, p.536-42, 1995.

DOBRINSKI, I., SUAREZ, S.S., BALL, B.A. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cell in vitro. *Biol. Reprod.*, v.54, p.783-88, 1996a.

DOBRINSKI, I., THOMAS, P.G.A., BALL, B.A. The oviductal sperm reservoir in the horse: functional aspects. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1996. *Proceedings...* 1996b. p.265-270.

EILTS, B.E., PINTO, C.R.F., PACCAMONTI, D.L., NIEMANSTVERDREIT, A.S., GARCIA, E., GODKE, R.A. Transvaginal intrafollicular sperm cell injection with concomitant artificial insemination in the cyclic mare. *Theriogenology*, v.58, p.631-633, 2002.

ELLINGTON, J.E., BALL, B.A., BLUE, B.J., WILKER, C.E. Capacitacion like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1505-10, 1993a.

ELLINGTON, J.E., BALL, B.A., YANG, X. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, v.98, p.203-8, 1993b.

ELLINGTON, J.E., SAMPER, J.C., JONES, A.E., OLIVER, S.A., BURNETT, K.M., WRIGHT, R.W. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Anim. Reprod. Sci.*, v.56, p.51-65, 1999.

- EVANS, J., WELLS, C., GREGORY, L., WALKER, S. A. Comparison of intrauterine insemination, intraperitoneal insemination, and natural intercourse in superovulated women. *Fertil. Steril.*, v.56, p.1183-87, 1991.
- FAKIH, H.M., VIJAYAKUMAN, R. improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafollicular transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil. Steril.*, v.1990, p.515-20, 1990.
- FANTINATI, P., ZANNONI, A., BERNARDINI, C., WEBSTER, N., LAVITRANO, M., FORNI, M., SEREN, E., BACCI, M.L. Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. *Theriogenology*, v.63, p.806-17, 2005.
- FIRST, N.L., SHORT, R.E., PETERS, J.B., STRATMAN, F.W. Transport and loss of boar spermatozoa in the reproductive tract of the sow. *J. Anim. Sci.*, v.27, p.1037-40, 1968.
- FOOTE, R.H., KARROTH, M.T. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and non-return rates revisited. *J.Dairy Sci.*, v.80, p.3072-6, 1997.
- FUNAHASHI, H., DAY, B.N. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.99, p.97-103, 1993.
- GARMA-AVINÃ. Cytology of 100 samples of abdominal fluid from 100 horses with abdominal disease. *Equine Vet. J.*, v.30, p. 435-44, 1998.
- GERARD, O., HUMBLLOT, P. Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on non-return rates estimates of fertility for individual Holstein bulls. *Theriogenology*, v.36, p.727-36, 1991.
- GINTHER, O.J. Reproductive Biology of the Mare. Cross Plains WI: Equiservices, 1992.
- GIORGETTI, C., HANS, E., SPACH J.L., AUQUIER, P., ROULIER, R. In vitro fertilization in cases with severe sperm defect: use of a swim-across technique and medium supplemented with follicular fluid. *Hum. Reprod.*, v.7, p.1121-5, 1992.
- GOMES, G.M. Efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll e inseminação artificial por endoscopia, sobre a fertilidade e reação inflamatória ao sêmen congelado de garanhões. Seropédica, 2002. 71p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- GRINDEM, C.B., FAIRLEY, N.M., UHLINGER, C.A., CRANE, S.A. Peritoneal fluid values from healthy foals. *Equine Vet. J.*, v.22, p. 359-61, 1990.
- GROSSFELD, R., KLINC, P., SIEG, B., RATH, D. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology*, v.63, p.2269-77, 2005.
- GÜVENC, K., REILAS, T., KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, v.63, p.2504-12, 2005.

- HAWK, H.W., TANABE, T.Y. effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulated and single-ovulating cattle. *J. Anim. Sci.*, v.63, p.551-60, 1986.
- HONG, S.J., TSE, J.Y.M., HO, P.C., YEUNG, W.S.B. Cumulus cells reduce the spermatozoa-zona binding inhibitory activity of human follicular fluid. *Fertil. Steril.*, v.79, p.802-7, 2003.
- HONG, C.Y., CHAO, H.T., LEE, S.L., WEI, Y.H. modification of human sperm function by human follicular fluid: a review. *Int. J. Androl.*, v.16, p.92-6, 1993.
- HOUSEHOLDER, D.D., PICKETT, B.W., VOSS, J.L., OLAR, T.T. Effect of extender, numbers of spermatozoa and hCG on equine fertility. *J. Equine Vet. Sci.*, v.1, p.9-13, 1981.
- HOVATTA, O., LÄHTEENMÄKI, P., KURUNMÄKI, H., KOSKIMIES, A., TIITINEN, A. Directing intraperitoneal or intrauterine insemination and superovulation in infertility treatment: a randomized study. *Fertil. Steril.*, v.54, p.339-41, 1990.
- HUNTER, R.H.F., WILMUT, I. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.5, p.167-73, 1982a.
- HUNTER, R.H.F., BARWISE, L., KING, R. Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. *Brit. Vet. J.*, v.138, p.225-232, 1982b.
- HUNTER, R.H.F. Pre- ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil.*, v.72, p.203-11, 1984.
- HUNTER, R.H.F., FLECHON, B., FLECHON, J.E. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: A scanning electron microscope study. *Tissue & Cell*, v.23, p.641-56, 1991.
- HUNTER, R.H.F. Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, v.17, p.85-125, 1995.
- HUNTER, R.H.F. Ovarian control of very low sperm: egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, v.44, p.417-422, 1996.
- HUNTER, R.H.F., GREVE, T. Deep uterine insemination in cattle: a fruitful way forward with small numbers of spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, v.39, p.149-63, 1998.
- HUNTER, R.H.F. Factors influencing Sperm Migration in the fallopian tubes. *Reprod. Dom. Anim.*, v.34, p.227-35, 1999.
- HYLAN, D., BELLOW, S., CARTER, J.A., COCHRAN, R.A., GODKE, R.A. Ultrasound-guided deep uterine insemination (DUI) of superovulated beef cows using low numbers of frozen-thawed spermatozoa. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Foz do Iguaçu, 2002. p.379.

- IZUKA, R. Artificial insemination. Progress and clinical application. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.626, p.399-413, 1991.
- JAIN, N.C. Hematology of horses. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, p. 140-75.
- JANSEN, R.P.S., J. SMIT, J.C. Pregnancies after ultrasound guided fallopian insemination with cryostored donor semen. *Fertil. Steril.*, v.49, p.920-22, 1988.
- JASKO, D.J., MARTIN, J.M., SQUIRES, E.L. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology*, v.37, p.1233-39, 1992.
- KARLSTRÖM, P.O., BERGH, T., BAKOS, O., LUNDKVIST, Ö., PALMSTIERNA, M. Direct intraperitoneal insemination – clinical results and comparison between two methods of sperm preparation. *Fertil. Steril.*, v.56, p.939-45, 1991.
- KATILA, T., SANKARI, S., MAKELA, O. Transport of spermatozoa in the genital tracts of mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, v.56, p.571-78, 2000.
- KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. *Anim.Reprod. Sci.*, v.68, p.267-272, 2001.
- KOTILAINEN, T., HUHTINEN, M., KATILA, T. Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, v.41, p.629-36, 1994.
- KRUEGER, C., RATH, D., JOHNSON, L.A. Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, v.52, p.1363-73, 1999.
- KURYKIN, J., JAAKMA, Ü., MAJAS, L., JALAKAS, M., AIDNIK, M., WALDMANN, A., PADRIK, P. Fixed time deep intracornual insemination of heifers at synchronized estrus. *Theriogenology*, v.60, p.1261-68, 2003.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C., ALVARENGA, M.A., SEIDEL Jr., G.E., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Penetration of zona-free Hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. *Theriogenology*, v.56, p.937-53, 2001.
- LEÃO, K.M. Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozoides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões. Botucatu, 2002.107p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.
- LEÃO, K.M., ALVARENGA, M.A., PUOLLI-FILHO, J.N. Hysteroscopic insemination in mares with low sperm number. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Foz do Iguaçu, 2002. p.381.

- LEFEBVRE, R., LO, M.C., SUAREZ, S. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol. Reprod.*, v.56, p.1198-1204, 1997.
- LESEC, G., MANHES, H., HARDY, R.I., RICHARD, E., FORCE, A., DEJARDIN, F., De MONTMARIN, J.L., GILBERT-JEANTET, P. In vivo transperitoneal fertilization. *Hum. Reprod.*, v.4, p.521, 1989.
- LINDSEY, A.C., VARNER, D.D., SEIDEL Jr, G.E., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at 5°C or 15°C prior to flow-cytometric sorting. *Anim. Reprod. Sci.*, v.85, p.125-130, 2005.
- LINDSEY, A.C., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.279-89, 2001.
- LINDSEY, A.C., MORRIS, L.H.A., ALLEN, W.R., SCHENK, J.L., GRAHAM, J.K., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Hysteroscopic insemination of fresh and frozen unsexed and sexed equine spermatozoa. In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2000, Finland. *Proceedings...* Finland, 2000. p.13.
- LIVI, C., COCCIA, E., VERSARI, L., PRATESI, S., BUZZONI, P. Does intraperitoneal insemination in the absence of prior sensitization carry with it a risk of subsequent immunity to sperm? *Fertil. Steril.*, v.53, p.137-42, 1990.
- LOPEZ-GATIUS. Site of deposition in cattle: a review. *Theriogenology*, v.53, p.1407-14, 2000.
- LÓPEZ-GATIUS, F. Intraperitoneal insemination in repeat breeder cows: a preliminary report. *Theriogenology*, v.44, p.153-58, 1995.
- LÓPEZ-GATIUS, F., YÁÑIZ, J. Intraperitoneal insemination and retrograde sperm transport in dairy cows. *J. Vet. Med.*, v.47, p.83-88, 2000.
- LUCENA, E., RUIZ, J.A., MENDONZA, J.C., LUCENA, A., LUCENA, C., ARANGO, A. Direct intrafollicular insemination: case report. *J. reprod. Med.*, v.36, p.525-6, 1991.
- LUKOSEVICIUTE, K., ZILINSKAS, H., JANUSKAUSKAS, A. Effect of exogenous progesterone on post-thaw capacitation and acrossome reaction of bovine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.39, p.154-161, 2004.
- MANNING, S.T., BOWMAN, P.A., FRASER, L.M., CARD, C.E. Development of histeroscopic insemination of the uterine tube in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore, 1998. p.84-85.

- MARÍN-BRIGGILER, C.I., VAZQUEZ-LEVIN, M.H., GONZALEZ-ECHEVERRÍA, F., BLAQUIER, J.A., TEZÓN, J.G., MIRANDA, P.V. Strontium supports human sperm capacitation but not follicular fluid – induced acrossome reaction. *Biol. Reprod.*, v.61, p.673-80, 1999.
- MARTINEZ, E.A., VAZQUEZ, J.L., VAZQUEZ, X.L., GIL,M.A., PARRILHA, I., ROCA, J. Successful low-dose insemination by a fiberoptic endoscope technique in the sow. In: PROCEEDINGS OF THE ANNUAL CONFERENCE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2000, Maastricht. Proceedings...Maastricht, 2000. p.201.
- MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., RHODES, S.L., HILLARD, M.A., BINDON, B.M. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Fert. Develop.*, v.5, p.57-63, 1993.
- McCUE, P.M., FLEURY, J.J., DENNISTON, D.J., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L. Oviductal insemination of mares. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, v.56, p.499-502, 2000.
- McKENNA, T., LENZ, R.W., FENTON, S.E., AX, R.L. Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.1179-83, 1990.
- McNUTT, T.L., KILLIAN, G.J. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J. Androl.*, v.12, p.244-252, 1991.
- MEINJTES, M., EILTS, B., COCHRAN, R., GRAFF, K., DENNISTRON, R., PACCAMONTI, D., GODKE, R. Transvaginal intrafollicular sperm cell injection in the cyclic mare. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, v.3, p. 39-40, 2001.
- MINOURA, H., TAKEUCHI, S., SHEN, X., SHIBAHARA, T., FUTAMURA, N., TOYODA, N. GnRH Agonist. Increasing the pregnancy rate after combined treatment with hMG/hCG and direct intraperitoneal insemination. *J. Reproductive Medicine*, v.44, p.18-22, 1999.
- MORALES, P., LLANOS, M., GUTIERREZ, G., KOHEN, P., VIGIL, P., VANTMAN, D. The acrossome reaction-inducing activity of individual human follicular fluid samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum. Reprod.*, v.7, p. 646-51, 1992.
- MORRIS, L.H.A., HUNTER, R.H.F., ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small number of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. fertil.*, v.118, p.95-100, 2000a.
- MORRIS, L.H.A., TIPLADY, C., COOK, B., WILSHER, S., LI, X., ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2000, Finland. *Proceedings...* Finland, 2000b. p.12.

- MORRIS, L.H.A., ALLEN, W.R. Reproductive efficiency of intensively managed thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.*, v.34, p.51-60, 2002a.
- MORRIS, L.H.A., ALLEN, W.R. An Overview of low dose insemination in the mare. *Reprod. Dom. Anim.*, v.37, p.206-10, 2002b.
- MORRIS, L.H., TIPLADY, C.A., ALLEN, W.R. The in vivo fertility of caudal epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, v.58, p.643-46, 2002c.
- MROUEH, A., MASTROIANNI, L. Insemination via intraperitoneal route in rabbits. *Fertil. Steril.*, v.17, p.76-82, 1966.
- MUNUCE, M.J., MARÍN-BRIGGILER, C.I., CAILLE, A.M., BERTA, C.L., CUASNICÚ, P.S., MORISOLI, L. Modulation of human sperm function by peritoneal fluid. *Fertil. Steril.*, v. 80, p.939-46, 2003.
- MUNUCE, M.J., CAILLE, A.M., BOTTI, G., BERTA, C.L. Modulation of human sperm function by follicular fluid. *Andrologia*, v.36, p.395-401, 2004.
- NAMBO, Y., HASEGAWA, T., SATO, F., OKI, H., KUSUNOSE, R., NAKAI, R., NAGATA, S., WATANABE, G., TAYA, K. The release of follicular fluid into the peritoneal cavity during ovulation in mares. *Theriogenology*, v.58, p.545-48, 2002.
- NAVARRO, M.C., VALENCIA, J., VÁZQUEZ, C., CÓZAR, E., VILLANUEVA, C. Crude Mare follicular fluid exerts chemotactic effects on stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.33, p.321-24, 1998.
- NICHOL, R., HUNTER, R.H.F., LAMIRANDE, E., GAGNON, C., COOKE, G.M. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs. *J. Reprod. Fertil.*, v.110, p.79-86, 1997.
- NIE, G.J., JOHNSON, K.E., WENZEL, J.G.W. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. *Anim. Reprod. Sci.*, v.79, p.103-109, 2003.
- NUOJUA-HUTTUNEN, S., TUOMIVAARA, L., JUNTUNEN, K., TOMÁS, C., KAUPPILA, A., MARTIKAINEN, H. *Human Reprod.*, v.10, p.91-3, 1995.
- ORIHUELA, P.A., ORTIZ, M.E., CROXATTO, H.B. sperm migration into and through the oviduct following artificial insemination at different stages of the estrous cycle in the rat. *Biol. Reprod.*, v.60, p.908-13, 1999.
- OVERSTREET, J.W., COOPER, G.W. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. The rapid transit phase of transport. *Biol. Reprod.*, v.19, p.101-14, 1978.

- PARKER, W.G., SULLIVAN, J.J., FIRST, N.L. Sperm transport and distribution in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, v.23, p.63-66, 1975.
- PARLEVLIET, J.M.; TREMOLEDA, J.M.; CHENG, F.P.; PYCOCK and OLENBRANDER, B. Influence of semen, extender and seminal plasma on the defence mechanism of the mare's uterus. *Pferdeheilkunde*. v. 13,p. 540, 1997.
- PARLEVLIET, J.M., LYNN, J.W., EILTS, B.E., LYLE, S.K., FERRER, M.S., ALJARRAH, A.A., PACCAMONTI, D.L. Failure of embryo development after intrafollicular insemination in the horse: due to the sperm viability? *Havemeyer Foundation Monograph Series*, v.14, p.61-63, 2004.
- PAU, S., ZEDDA, M.T., CARLUCCIO, A., SCHIAFFINO, G., BOGLIOLO, L., LEDDA, S., LEONI, G., NAITANA, S. Direct intrauterine insemination using an innovative approach to overcome the laparoscopic technique in sheep. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguauçu. *Proceedings...* Foz do Iguauçu, 2002. p.383.
- PETERSEN, M.M., WESSEL, M.T., SCOTT, M.A., LIU, I.K.M., BALL, B.A. Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.58, p.663-665, 2002.
- POLLARD, J.W., PLANTE, C., KING, W.A., HANSEN, P.J., BETTERIDGE, K.J., SUAREZ, S.S. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.*, v.44, p.102-7, 1991.
- PONCHIROLLI, C.B., LANDIM-ALVARENGA, F.C., ALVARENGA, M.A., CARVALHO, L.R., GRAHAM, J.K. Induction of acrosome reaction in fresh and frozen / thawed bovine and equine semen treated with calcium ionophore A23187, dilauroyphosphatidilcholine and metil- β -cyclodextrin. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguauçu. *Proceedings...* Foz do Iguauçu, 2002. p.692.
- PYCOCK, J.F. Management of the problem breeding mare. The Society for Theriogenology. *Proceedings of the Annual Conference*. p. 79 – 89, 1999.
- RAGNI, G., LOMBROSO, G.C., WYSSLING, H., PEROTTI, L., CAVIONI, C., CROSIGNANI, P.G. Pregnancy after intraperitoneal insemination during a natural cycle. *Gynecol. Obstet. Invest.*, v.29, p.307-8, 1990.
- RAGNI, G., LENZI, A., GANDINI, L., CRISTIANI, C., LOMBROSO, G.C., OLIVARES, M.D., WYSSLING, H., DONDERO, F., CROSIGNANI, P.G. Lack of immunization after intraperitoneal insemination of spermatozoa. *Andrologia*, v.25, p.3-5, 1993.

- RATH, D., KRÜGER, C., JOHNSON, L.A. Deep intra-uterine insemination techniques in pigs. In: 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm, 2000. p.290.
- RATHI, R., COLENBRANDER, B., STOUT, T.A.E., BEVERS, M.M., GADELLA, B.M. Progesterone induces the acrossome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase-dependent pathway. *Theriogenology*, v.58, p.307-11, 2002.
- RIGBY, S.L., LINDSEY, A.C., BRINSKO, S.P., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.C., VARNER, D.D. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or rectally-guided uterotubal insemination with low sperm number. In: 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 2001, Fort Collins. *Proceedings...* Fort Collins, 2001. p.49.
- RIGBY, S.L., DEREZO, S. BRINSKO, S., BLANCHARD, T., TAYLOR, T., FORREST, D. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In: AMERICAN ASSOCIATION ON EQUINE PRACTICE, 2000, San Antonio. *Proceedings...* San Antonio, 2000. p.332-4.
- ROCA, J., CARVAJAL, C., CUELLO, C., LUCAS, X., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A. Fertility of cryopreserved boar spermatozoa after transcervical deep intrauterine insemination. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Foz do Iguaçu, 2002. p.385.
- ROWLANDS, I.W. Insemination of the guinea pig by intraperitoneal injection. *J. Endocrinol.*, v.16, p.98-106, 1957.
- SAMPER, J.C., MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.49, p.895-903, 1998.
- SCHUMACHER, J., SPANO, J.S., MOLL, H.D. Effects of enterocentesis on peritoneal fluid constituents in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* V.186, p.1301-03, 1985.
- SCOTT, M.A., LIU, I.K.M., OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical implications. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICE, 1995, USA. *Proceedings...* USA, 1995. p.1-2.
- SCOTT, M.A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.337-48, 2000.
- SCOTT, M.A., LIU, I.K.M., OVERSTREET, J.W., ENDERS, A.C. The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa *in situ* using scanning electron microscopy. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, v.56, p.415-21, 2000.

- SCOTT, M.A., VARNER, D.D., LIU, I.K.M., ENDERS, A.C. Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy. *Theriogenology*, v.58, p.639-42, 2002.
- SEIDEL Jr, G.E., SCHENK, J.L., HERICKHOFF, L.A. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, v.52, p.1407-20, 2000.
- SENGER, P.L., BECKER, W.C., DAVIDGE, S.T., HILLERS, J.K., REEVES, J.J. Influence of cornual insemination on conception rates in dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, v.66, p.3010-16, 1988.
- SIEGEL, S. Estatística não paramétrica. McGraw-Hill. São Paulo 350p.1975.
- SIEME, H., BONK, A., HAMANN, H., KLUG, E., KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, v.62, p.915-28, 2004.
- SILVA, L.A., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., JACOB, J.C.F., REIS, C.P., GINTHER, O.J. A new alternative for embryo transfer and artificial insemination in mares: ultrasound-guided intrauterine injection. *J. Equine Vet. Sci.*, v.24, p.324-32, 2004.
- SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., GRAHAM, J.K., VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E. *Cooled and Frozen Stallion Semen*. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. (Apostila).
- SQUIRES, E.L., LINDSEY, A.C., BUCHANAN, B.R. A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICE, 2000, USA. *Proceedings...* USA, 2000. p.335.
- SQUIRES, E.L. Low dose insemination. In: 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 2001. Fort Collins. *Proceedings...* Fort Collins, 2001. p.28.
- SQUIRES, E.L., REGER, H.P., MACLELLAN, L.J., BRUEMMER, J.E. Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology*, v.58, p.655-58, 2002.
- STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, S., SKIPOR, J., WASOWSKA, B., KRZMOWSKI, T. local increase in steroid concentration in blood supplying the uterus and oviduct in anaesthetized and conscious gilts. *Anim. Reprod. Sci.*, v.37, p. 35-41, 1994.
- SUAREZ, S.S., REDFERN, K., RAYNOR, P., MARTIN, F., PHILLIPS, D.M. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviducts in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol. Reprod.*, v.44, p.998-1004, 1991.
- SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. *Biol. Reprod.*, v.58, p.1105-07, 1998.

- THÉRIEN, I., BOUSQUET, D., MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, v.65, p.41-51, 2001.
- THÉRIEN, I., MANJUNATH, P. Effect on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Biol. Reprod.*, v.69, p.1408-15, 2003.
- THOMAS, P.G.A., BALL, B.A., BRINSKO, S.P. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biol. Reprod.*, v.51, p.222-28, 1994a.
- THOMAS, P.G.A., BALL, B.A., MILLER, P.G., BRINSKO, S.P., SOUTHWOOD, L. A Subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biol. Reprod.*, v.51, p.303-9, 1994b.
- THOMAS, P.G.A., BALL, B.A., IGNOTZ, G.G., DOBRINSKI, I., PARKS, J.E., CURRIE, W.B. Antibody directed against plasma membrane components of equine spermatozoa inhibits adhesion of spermatozoa to oviduct epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.*, v.56, p.720-30, 1997.
- TIEMESSEN, C.H.J., BOTS, R.S.G.M., PEETERS, M.F., EVERS, J.L.H. Direct intraperitoneal insemination compared to intrauterine insemination in superovulated cycles: A randomized cross-over study. *Gynecol. Obstet. Invest.*, v.44, p. 149-52, 1997.
- TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M., CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*, v.50, p.807-18, 1998.
- TROEDSSON, M.H.T., LOSET, K., ALGHAMDI, A.M., CRABO, B.G., Interaction between Equine Semen and the endometrium: The Inflammatory response to semen. *Proceedings... 3RD International Symposium on Stallion Reproduction*. Fort Collins, Colorado Spring. p.27 2001.
- TURHAN, N.O., ARTINE, P.G., D'AMBROGIO, G., DROGHINI, F., VOLPE, A., GENAZZANI, A.R. Studies on direct intraperitoneal insemination in the management of male factor, cervical factor, unexplained and immunological infertility. *Hum. Reprod.*, v.7, p.66-71, 1992.
- VANDEN BOSCH, G.C., HAFEZ, E.S.E. Sperm transport and distribution in the reproductive tract of the female rabbit after intraperitoneal insemination. *Fertil. Steril.*, v.25, p.1039-45, 1974.
- VAN PELT, L.F. Intraperitoneal insemination of *Macaca mulatta*. *Fertil. Steril.*, v.21, p.159-62, 1970.
- VAZQUEZ, J.J., MEDINA, V., LIU, I.K., BALL, B.A., SCOTT, M.A. Nonsurgical uterotubal insemination in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. *Proceedings... Baltimore*, 1998. p.82-3.

- VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., ROCA, J., VAZQUEZ, J.L., LUCAS, X., GIL, M.A., PARRILLA, I.A.I. A.I. in swine: new strategy for deep insemination with low number of spermatozoa using a non-surgical methodology. In: 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm, 2000. p.289.
- VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., PARRILLA, I., CUELLO, C., CARVAJAL, G., GIL, M.A., LUCAS, X., CENTURION, F., VAZQUEZ, J.L., ROCA, J. Deep intrauterine insemination in sows with flow cytometric sorted sperm. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Foz do Iguaçu, 2002. p.389.
- VILLANUEVA, C., VADILLO, O., KABLY, A., DIAZ, M.A., KARCHMER, S. Evidence that human follicular fluid contains a chemiottractant for spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v.54, p.1180-82, 1990.
- WATSON, P.F. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. *Equine Vet. J.*, v.20, p.397, 1998.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.30-31, p.481-92, 2000.
- WOLKEN, A., RATH, D., BORTOLOZZO, F., WENTZ, I., MARQUETTI, A. Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. In: 28TH ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Foz do Iguaçu, 2002. p.392.
- YANIZ, J.L., LÓPEZ-BEJAR, M., SANTOLARIA, P., RUTLLANT, J., LÓPEZ-GATIUS. Intrapерitoneal insemination in mammals: A review. *Reprod. Dom. Anim.*, v.37, p.75-80, 2002.
- YAO, Y.Q., YEUNG, W.S., HO, P.C. Human follicular fluid inhibits the binding of human spermatozoa to zona pellucida in vitro. *Hum. Reprod.*, v.11, p.2674-80, 1996.
- YAO, Y.Q., HO, P.C., YEUNG, W.S.B. Effects of human follicular fluid on spermatozoa that have been cocultured with human oviductal cells. *Fertil. Steril.*, v.72, p.1079-84, 1999.
- YAO, Y.Q., HO, P.C., YEUNG, W.S.B. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v.73, p.680-6, 2000.
- YEE, B., CUMMINGS, L.M. Modification of the sperm penetration assay using human follicular fluid to minimize negative results. *Fertil. Steril.*, v.50, p.123-8, 1988.
- ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey, p.718, 1996.

ZBELLA, E.A., TARANTINO, S., WADE, R. Intrafollicular insemination for male infertility. *Fertil. Steril.*, v.58, p.442-3, 1992.

ZENT, W.W., TROEDSSON, M.H. AND XUE, Y.L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares. A field Study. *Proc. Am. Assoc. Eq. Pract.* v. 44, p. 64-65, 1998.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the viability, *in vitro*, of stallion frozen semen after dilution in mare's pre-ovulatory follicular fluid; assess sperm population in mares' oviduct using different artificial insemination techniques; verify the fertility of different artificial insemination techniques in mares with low sperm number; assess if mares develop an inflammatory reaction in the peritoneal cavity after intraperitoneal and intrafollicular insemination and to verify if the presence of sperm in pre-ovulatory follicle could interfere on oocyte fertilization capacity.

In experiment 1, frozen-thawed semen viability was evaluated without dilution (GI) and after dilution with Kenney or Mare's pre-ovulatory follicular fluid. The percentage of sperm with plasmatic membrane integrity was not different between the groups ($p > 0,05$). No statistical difference ($p > 0,05$) was observed between the groups in percentage of live sperm with intact acrosome. Total motility (MT) was significantly lower ($p < 0,05$) in follicular fluid group (GIII) just in the first moment (T0). Progressive motility was significantly higher ($p < 0,05$) in group diluted with Kenney (GII) than the other groups in T0 and 3 hours after (T3). Average path velocity (VAP) was significantly higher ($p < 0,05$) in GIII than GI in moments T0, T1 and T2. Straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) and Beat cross frequency (BCF) were significantly lower ($p < 0,05$) in GI in moments T0, T1 and T2, when compared with GIII. No statistical difference ($p > 0,05$) were observed in amplitude of lateral head (ALH), straightness (STR) and percentage of sperm with linear (LIN) and rapid (RAP) movement between GI and GIII in any moment. In T3 no statistical difference was observed ($p > 0,05$) between all groups in any motility parameters analyzed.

In experiment 2, sperm population in the oviduct was evaluated, after artificial insemination with stallion fresh and frozen semen, using techniques insemination in uterine body (IACU), in the tip of the uterine horn (IAPC), hysteroscopy (IAH) and intraperitoneal (IAIP). Mares were slaughtered 12 hours after insemination to flush the oviducts. After insemination with stallion A frozen semen, the percentage of oviducts that were found spermatozoa (average of sperm number found per oviduct) in groups GIA (IACU; 20×10^6), GIB (IAPC; 20×10^6), GIC (IAH; 20×10^6), GID (IACU; 500×10^6) were respectively zero (0%), 40% (4500), 25% (2500), 25% (1250), no statistical difference was observed between the groups ($p > 0,05$). After inseminations with stallion B fresh semen, the percentage of oviducts that were found spermatozoa (average of sperm number found per oviduct) in groups GIIA (IACU; 20×10^6), GIIB (IAPC; 20×10^6), GIIC (IAH; 20×10^6), GIID (IACU; 500×10^6) and

GIIE (IAIP; 100×10^6) were respectively zero (0%), 40% (1000), 50% (1850), 80% (7750) and zero (0%). The percentage of oviducts with spermatozoa in GIIA was not statistically different ($p > 0,05$) of GIIB and GIIE. However, was lower ($p < 0,05$) than GIIC and GIID. The average of sperm number found per oviduct was significantly higher ($p < 0,05$) in GIID than the other groups. After inseminations with stallion B frozen semen no spermatozoa was found in any oviduct of any following groups GIIIA (IACU; 20×10^6), GIIIB (IAPC; 20×10^6), GIIIC (IAH; 20×10^6), GIIID (IACU; 500×10^6). The, *in vitro*, sperm recovered rate after deposition of 20×10^6 spermatozoa in mare's pre-ovulatory follicle was in average $4,827 \times 10^6$, representing just 24,13% of total sperm number deposited in follicles.

No pregnancy was observed in the groups of mares inseminated by intrafollicular insemination (GIV; IAIF; frozen semen; 20×10^6) and by intraperitoneal insemination (GV; IAIP; fresh semen; 100×10^6). The pregnancy rate of GI (15%; IACU; frozen semen; 20×10^6) was not different ($p > 0,05$) of GII (40%; IAPC; frozen semen; 20×10^6) and GII (45%; IAH; frozen semen; 20×10^6), also it was not different ($p > 0,05$) of GIV and GV. The pregnancy rate of GII and GIII were not different ($p > 0,05$), but they were higher ($p < 0,05$) than GIV and GV.

The evaluation of the inflammatory reaction in peritoneal cavity after intraperitoneal and intrafollicular insemination was evaluated, by peritoneal fluid analysis, collected by paracentesis, showed that all parameters analyzed, just the percentage of lymphocytes and eosinophils, glucose concentration and the presence of blood cells didn't differ ($p > 0,05$) significantly between moment T0 (before insemination; GIP0) and 6 hours after intraperitoneal inseminations (GIP6). When we analyzed the inflammatory reaction after intrafollicular insemination, we observed that just the percentage of lymphocytes and eosinophils didn't differ significantly ($p > 0,05$) between moment T0 (GIF0) and 6 hours after intrafollicular insemination (GIF6). No statistical difference was observed ($p > 0,05$) in any analyzed parameters between GIP6 and GIF6. When we verify the inflammatory reaction after the first paracentesis, without inseminations (GC0 x GC6), and the inflammatory reaction after the first paracentesis and ovulation, without insemination (GCO0 x GCO6), we didn't observe statistical difference ($p > 0,05$) in any analyzed parameters.

In experiment 5, the pregnancy rate of GA (50%), the group that mares were inseminated at the same time with 20×10^6 spermatozoa by IAIF (stallion frozen semen) and 500×10^6 spermatozoa by IACU (donkey fresh semen), was not different ($p > 0,05$) of GB (83,33%), that mares were inseminated just with 500×10^6 spermatozoa by IACU (donkey fresh semen).

Based on the results of the present experiment, we can concluded that: until 3 hours after dilution, the follicular fluid doesn't have deleterious effect to sperm viability, the inseminations technics IAPC and IAH are more efficient than IACU, when used low inseminant dose. IAIF and IAIP inseminations technics were not efficient to obtain fertilization and the failure of IAIF technique is not exclusively related with disturbs on oocyte viability alone, there are other factors involved.

Keywords: Equine; frozen semen; insemination technics; low dose; sperm transport, sperm viability.

APÊNDICE

A - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, antes da inseminação intraperitoneal (T0).

Animal	densidade	pH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1016	8	200	50	3	3350	950	53	46	0	1
2	1010	8	1200	50	3	68750	1980	64	25	10	1
3	1015	8	600	50	3	3000	1650	52	38	10	0
4	1012	8	100	100	3	240	620	39	46	14	1
5	1012	8	500	50	3	20350	3520	36	60	4	0
6	1013	8	500	50	2	120	920	42	56	2	0
7	1018	8	1000	50	3	600	4750	46	48	6	0
8	1010	8	500	100	3	5800	610	33	62	5	0
9	1022	8	1800	50	3	3270	1950	68	26	5	1
10	1014	8	600	100	3	910	820	43	52	5	0
11	1014	8	200	50	1	70	1470	42	53	5	0
12	1012	8	30	0	3	630	1880	40	53	7	0
13	1018	8	1000	100	3	9400	360	16	73	8	3
14	1016	7,5	1000	50	3	6270	1210	48	46	6	0
15	1016	7,5	500	100	3	3300	880	73	17	10	0

B - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, 6 horas após a inseminação intraperitoneal (T6).

Animal	densidade	pH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1010	8	500	50	3	5350	2200	77	22	1	0
2	1027	7,5	300	0	3	8100	63800	89	9	2	0
3	1018	8	1200	50	3	22250	13550	86	1	13	0
4	1014	7,5	500	50	3	1350	22750	90	9	1	0
5	1012	8	500	50	3	51150	9240	92	5	3	0
6	1020	7,5	1800	50	3	2640	34100	91	7	2	0
7	1015	8	1600	50	3	1000	3300	51	39	10	0
8	1011	8	500	50	3	99000	4290	77	17	6	0
9	1020	7	1600	100	3	41500	26000	89	8	3	0
10	1018	7	1400	100	3	21500	23750	91	6	3	0
11	1018	8	1400	50	3	58500	20250	85	12	3	0
12	1020	7,5	1800	50	3	6500	34000	96	2	2	0
13	1024	7	2400	50	3	6750	53000	85	7	8	0
14	1016	7,5	1200	100	3	10700	4550	75	26	2	0
15	1023	7	500	0	3	65450	63800	91	7	2	0

C - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, antes da inseminação intrafolicular (T0).

Animal	densidade	pH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1018	8	1200	50	3	42000	3900	63	31	6	0
2	1010	7,5	500	100	1	5	242	24	71	5	0
3	1010	8	500	100	3	9150	400	67	11	21	1
4	1012	7,5	500	100	1	200	1670	61	34	5	0
5	1010	8,5	100	300	1	69	902	55	40	5	0
6	1012	7,5	100	100	3	1531	288	9	87	3	1
7	1014	8	200	50	3	1040	1750	51	48	1	0
8	1010	7,5	500	100	1	120	360	79	11	10	0
9	1012	8	500	100	3	400	800	15	81	4	0
10	1010	7,5	500	100	1	40	340	75	18	7	0
11	1012	7,5	500	100	3	1700	690	62	22	18	0
12	1016	8	500	50	1	30	2450	68	21	11	0
13	1016	7,5	600	30	3	2350	1350	63	26	11	0
14	1012	7,5	500	100	1	60	380	73	20	7	0

D - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, 6 horas após a inseminação intrafolicular (T6).

Animal	Densidade	pH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1026	7	500	50	3	45500	67000	73	25	2	0
2	1018	7	1000	50	3	2090	25630	89	11	0	0
3	1021	7	2000	30	3	11200	47000	90	7	3	0
4	1025	7	2800	0	3	12600	87000	91	7	2	0
5	1020	7,5	500	50	3	3533	28350	97	3	0	0
6	1020	8	2200	50	3	33000	19777	93	5	2	0
7	1022	7,5	2000	50	3	147000	72000	95	3	2	0
8	1020	7,5	1700	30	3	65000	53000	92	3	5	0
9	1020	7,5	1800	50	3	3400	26000	96	0	4	0
10	1010	7,5	500	100	3	1300	340	59	19	22	0
11	1023	7	500	50	3	4800	54000	92	2	6	0
12	1019	7	1400	30	3	10450	21340	91	8	1	0
13	1016	7,5	1000	100	3	7920	999	78	15	7	0
14	1014	7,5	500	100	3	7150	1100	48	40	12	0

E - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, no momento da primeira paracentese (T0) do grupo controle GC

Animal	densidade	PH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1011	8	500	50	3	8300	1290	82	15	3	0
2	1016	8	500	50	3	920	1460	74	21	5	0
3	1018	8	1100	50	3	110250	1980	52	43	5	0
4	1012	8	500	100	2	90	1200	69	30	1	0

F - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, no momento da segunda paracentese (T6) do grupo controle GC

Animal	densidade	PH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1012	8	800	100	3	520	750	87	9	4	0
2	1016	7,5	500	100	2	160	1110	81	17	2	0
3	1016	8	500	100	3	53550	11990	83	8	2	1
4	1014	8	800	100	3	1280	970	85	14	1	0

G - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, no momento da primeira paracentese (T0) do grupo controle ovulação GCO

Animal	densidade	PH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1016	8	500	50	3	52500	5500	55	44	1	0
2	1012	8	500	50	3	4750	2070	50	38	12	0
3	1014	8	500	100	3	450	2450	69	20	11	0

H - Resultados individualizados de densidade, pH, concentração de proteína, concentração de glicose, presença de sangue oculto, número total de hemácias, número total de células nucleadas, porcentagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, no momento da segunda paracentese (T6) do grupo controle ovulação GCO

Animal	densidade	PH	Proteína (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Sangue (0-3)	Número hemácias	Número Células	Neutrófilos (%)	Macrófagos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	1016	8	1000	100	3	3550	6250	73	21	6	0
2	1014	8	500	50	3	18700	4620	88	8	4	0
3	1016	8	800	100	3	22000	2090	75	12	12	1

I - Avaliações das cinco partidas de sêmen congelado do garanhão A, utilizadas na parte I e III do experimento 2 e no experimento 3.

	MT	MP	VAP	VCL	VSL	ALH	BCF	STR	LIN	RAP	FLU
Partida 1	65	25	94,4	70,3	171,1	7,3	27,7	74	42	50	45
Partida 2	68	24	90,9	68,1	166,9	7,5	27,1	75	42	54	53
Partida 3	63	23	108,3	80,2	192,1	7,1	30,7	74	43	51	40
Partida 4	60	32	94,1	76,7	161,0	5,9	35,5	81	48	48	51
Partida 5	61	23	103,3	77,9	193,6	8,2	31,8	75	41	46	47

J - Avaliações das duas partidas de sêmen congelado do garanhão B, utilizadas na parte II do experimento 2.

	MT	MP	VAP	VCL	VSL	ALH	BCF	STR	LIN	RAP	FLU
Partida 1	69	20	97,7	70,5	181,7	7,9	25,6	72	40	53	52
Partida 2	72	23	99,8	72,1	182,4	7,9	25,0	72	41	57	50

K – Protocolo de criopreservação de sêmen utilizado.

A colheita de sêmen dos garanhões A (raça: Árabe) e B (raça: Crioulo) foram realizadas com vagina artificial, o sêmen era encaminhado para o laboratório onde era filtrado, para retirada da porção gel do ejaculado e em seguida realizava-se a avaliação da concentração espermática e dos parâmetros de motilidade.

O sêmen era diluído na proporção de 1:1 com meio de centrifugação, a base de leite em pó e centrifugado por 10 minutos a 600g. O sobrenadante era descartado e o *pellet* formado ressuspendido com o meio de congelação FR4[®] (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP) acrescido de 5% do crioprotetor Dimetil-formamida[®] (Sigma Chemical Company, ST. Louis, MO).

Após homogenização, o sêmen era envasado em palhetas de 0,5 ml e mantidos por uma hora em geladeira a 5°C. Posteriormente à refrigeração, as palhetas de sêmen eram mantidas por 20 minutos em vapor de nitrogênio, a 6 cm do mesmo, em caixa de isopor. Após este período as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de sêmen contendo nitrogênio líquido.