



Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Agrárias

Mestrado em Zootecnia

**Eficiência *in vivo* e *in vitro*, de Três Diluidores de
Sémen de Coelho Refrigerado**



Orientador: Professor Doutor F. Moreira da Silva

Coorientador: Doutor A. Chaveiro

Docente: Lisandra Ventura Parreira

Angra do Heroísmo, Novembro de 2013

Índice

Índice.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract	viii
I –Introdução	1
II - Revisão bibliográfica.....	3
2.1 – Caracterização e Avaliação do Macho Reprodutor	3
2.1.1 - Anatomia Reprodutiva do Coelho	3
2.1.2 - Produção e Constituição dos SPZ e Ejaculação	4
2.1.3 - Fisiologia Reprodutiva do Coelho.....	6
2.1.4 - Parâmetros de Avaliação do Sêmen	7
2.1.4.1 - Volume.....	8
2.1.4.2 - Fração gel	8
2.1.4.4 - Cor e Aspeto	8
2.1.4.3 - Concentração	9
2.1.4.6 - Motilidade	9
2.1.4.5 - Vigor.....	10
2.1.4.7 - Morfologia Espermática.....	10
2.2 – Caracterização e Avaliação da Fêmea Reprodutora.....	10
2.2.1 - Fisiologia Reprodutiva da Coelha	10
2.3 - Utilização da IA em Cunicultura	12
2.4 - Análise por Citometria de Fluxo.....	13
2.4.1 - Considerações Gerais Sobre a Utilização da Citometria de Fluxo	13
2.4.2 - Citómetro de Fluxo e Fluorocromos	14
2.4.3 - Caraterização do Citómetro de Fluxo	15
2.4.4 - Compostos Fluorescentes FITC-PSA/Pi e Sybr-14/Pi	17
2.4.5 – Avaliação da Viabilidade Espermática no Citometro de Fluxo.....	18
2.4.6 – Avaliação da Capacitação e da Reação Acrossômica no Citometro de Fluxo	19
III - Materiais e Métodos.....	22

3.1. - Caracterização da Exploração	22
3.3. - Recolha, Processamento e Diluição do Sémén	24
3.4 - Avaliação <i>in vitro</i> do Sémén.....	26
3.4.1-Avaliação da Integridade do Acrossoma dos SPZ por Citometria de Fluxo:	26
3.4.2-Avaliação da Viabilidade Espermática por Citometria de Fluxo	26
3.4.3-Avaliação da Viabilidade Espermática <i>in vivo</i>	27
3.5 - Tratamento Estatístico dos Resultados	28
IV-Resultados e Discussão	29
4.1- Viabilidade espermática através do Sybr-14/Pi.....	29
4.2. Integridade do acrossoma utilizando FITC-PSA/Pi.	31
4.3- Análise da viabilidade espermática por IA.....	33
V - Considerações Finais.....	35
VI - Referencias Bibliográficas	37

Resumo

Diversos estudos têm sido realizados ao sémen, avaliando essencialmente a concentração de espermatozóides (SPZ), a sua mobilidade e morfologia.

A viabilidade do sémen muitas vezes é testada através da mobilidade espermática, pois é sempre necessário uma boa motilidade dos SPZ para que o sémen consiga atingir o oócito e fecundar. O estado do acrossoma é um dos parâmetros importantes a analisar, pois este encontra-se relacionado com o processo de penetração do SPZ no oócito.

Este trabalho teve como objetivo testar a eficiência *in vitro* e *in vivo*, de três diluidores de sémen de coelho refrigerado. Para a testagem dos meios de diluição *in vitro* utilizou-se a técnica de citometria de fluxo, com dois fluorocromos, sendo que para testar a viabilidade utilizou-se o Sybr-14/Pi e para testar a integridade do acrossoma utilizou-se o fluorocromo FITC-PSA/Pi.

Para o teste aos diluidores *in vivo*, utilizou-se a técnica de inseminação artificial (IA), realizando a recolha de sémen e posteriormente diluir o sémen nos respetivos diluidores e inseminar as coelhas.

Com base nos resultados obtidos pela análise por citometria de fluxo, no teste a viabilidade o diluidor Lactato de Ringer (LR), apresenta uma média superior ao meio Gema de Ovo (GO) e Leite Desnatado (LD), mas não apresentando diferenças significativas ($P > 0.05$).

Para o teste a integridade do acrossoma, através dos resultados obtidos pela análise do citómetro de fluxo, pode-se verificar que o meio de diluição LR apresenta novamente, médias superiores aos outros meios, mas sem apresentar diferenças significativas ($P > 0.05$).

Ao comparar a média dos meios de diluição testados *in vivo*, é possível verificar que os meio LR apresentam uma média superior de láparos nascidos vivos, sendo que é observado que existe uma diferença significativa ($P \leq 0.05$) com o meio GO.

Palavras-chave: Sémen, Citometria de Fluxo, Espermatozóides, Viabilidade, Acrossoma, Fluorocromos.

I – Introdução

Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus* L.) são zoológicamente mamíferos da família dos *Leporídeos* e do género *Oryctolagus*. Os coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) são descendentes do coelho selvagem e encontram-se amplamente distribuídos por toda a Europa e restantes continentes, sendo possível caracterizar-se cerca de meia centena de raças e variedades, resultantes da ação do homem, através de cruzamentos e pelas novas condições de vida, fruto da domesticação (Almeida, 1977). Possuem características muito importantes para a produção animal, representando um significativo papel como produtores de carne para alimentação humana. A carne desta espécie é caracterizada por possuir um sabor muito peculiar, por ser de cor branca, apresentar maior teor em proteína, cálcio e sobretudo um baixo teor de gordura proveniente dos ácidos gordos insaturados (Lebas et al.,1996).

Conhecida como uma espécie muito prolífera, o coelho possui um rápido crescimento, é considerada uma espécie precoce e possui um reduzido período de gestação. O melhoramento dos alimentos compostos e da genética, o aperfeiçoamento das instalações e dos equipamentos e o progresso no manejo desta espécie, contribuiu para que hoje em dia seja possível a produção de carne de coelho em grande escala e com elevada produtividade (Carvalho, 2009). Como o que sucedeu em quase todo o tipo de produções pecuárias, a técnica de Inseminação Artificial (IA), tornou-se essencial para o progresso zootécnico registado nas últimas décadas (Andrade et al., 2008). As primeiras tentativas de IA em coelhos foram realizadas nos anos 20, sendo publicados os primeiros resultados somente em 1950. Ao longo dos anos 70, foram desenvolvidos estudos referentes à técnica de IA, em vários países, nomeadamente na França, na Alemanha, na Hungria e na Itália (Boussit, 1989; Lebas *et al.*,1991). Atualmente, a IA é

usada na cunicultura intensiva como uma prática corrente, permitindo assim a escolha apropriada do reprodutor nas devidas condições de saúde e capacidade funcional. A recolha do sémen permite o controlo de qualidade, uma diminuição do número de machos na exploração, otimizando o rendimento da mão-de-obra. Esta técnica permite melhorar o controlo sanitário das explorações, pois reduz drasticamente a transmissão de doenças através do contacto entre os reprodutores e possibilita o desenvolvimento de um novo sistema de produção, chamado de sistema de produção cíclica, que consiste em agrupar animais no mesmo estágio fisiológico, permitindo inseminar as coelhas em dias fixos (Boussit , 1989; Lebas *et al.*,1991).

Desta forma, o objetivo principal do presente trabalho foi a avaliação *in vitro* do sémen de coelhos, recorrendo à técnica de microscopia de contraste de fase e de citometria de fluxo após refrigeração do sémen durante 0, 1 e 2 horas a 5°C. O sémen foi ainda avaliado *in vivo* pela inseminação artificial de 36 coelhas previamente superovuladas com PMSH e sincronizadas com GnRH.