

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRAUTERINA E CERVICAL EM OVELHAS UTILIZANDO SÊMEN REFRIGERADO

(Intrauterine and cervical artificial insemination in sheep using cooled semen)

MILCZEWSKI, V.¹; KOZICKI, L.E.²; LUZ, S.L.N.³; NEVES, J.P.⁴

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFPR;

²Departamento de Medicina Veterinária – UFPR;

³Curso de Medicina Veterinária – UTP;

⁴Departamento de Clínica de Grandes Animais – UFSM.

RESUMO – O presente trabalho objetivou verificar a prenhez de ovelhas inseminadas por via intrauterina ou cervical com sêmen refrigerado a 5°C durante 8 horas nos diluentes citrato-gema e Cornell University Extender (CUE). Foram utilizados 4 carneiros da raça Suffolk. Em cada inseminação era colhido sêmen de 2 animais e após a avaliação seminal as amostras eram homogeneizadas, divididas em 2 alíquotas e diluídas na proporção de uma parte de sêmen para três de diluente em citrato-gema e CUE. A diluição ocorria a 30°C e o abaixamento progressivo da temperatura se dava em 2 horas em caixa de isopor contendo gelo. As amostras permaneceram nesta temperatura durante 8 horas. Foram inseminadas 91 ovelhas mestiças da raça Suffolk, as quais tiveram o estro sincronizado com pessários vaginais impregnados com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, permanecendo por 14 dias, quando se administrou 500 UI de Gonadotrofina Coriônica (eCG) via intramuscular. Todas as ovelhas foram inseminadas independente do aparecimento do estro. A aplicação do sêmen foi realizada pela via cervical e intra-uterina por laparoscopia. A dose mínima inseminante foi de 250 milhões de espermatozoides, em volume de 0,4 ml, por ovelha. A utilização do diluente CUE resultou em 69,56% (n=23) e 8,33% (n=24) de prenhez para as vias intra-uterina e cervical, respectivamente contra 85,71% (n=21) e 21,74% (n=23) para o diluente citrato-gema. O sêmen diluído em citrato-gema forneceu índices de prenhez superiores, porém não significativos ($P>0,05$), nas duas vias estudadas em relação ao CUE. A fertilidade foi superior quando se utilizou a via intra-uterina ($P<0,05$) nos 2 diluentes testados. Foi possível refrigerar o sêmen ovino por 8 horas em citrato-gema obtendo-se boas taxas de prenhez quando se utilizou a via intra-uterina. A capacidade de fertilização do sêmen refrigerado é satisfatória desde que seja depositado pela via intrauterina.

Palavras chave: ovinos, sêmen refrigerado, inseminação artificial.

ABSTRACT – A study was carried out on ewe pregnancy rates by means of intrauterine or cervical insemination with semen cooled during 8 hours at 5°C. Four Suffolk rams were used as semen donors. After the semen evaluation, the samples were pooled, divided in two aliquots, each aliquot being then diluted, at 30°C, in 3 volumes of citrate-yolk or Cornell University Extender (CUE). After this step, the samples were progressively cooled down and maintained for 8 hours at 5°C and then used for artificial insemination. A total of 91 crossbred Suffolk ewes had the estrus synchronized with intravaginal pessaries containing 50 mg of medroxyprogesterone acetate. At the 14th day, following the removal of the pessaries, to each animal 500 IU of equine chorionic gonadotrophin has been injected intramuscularly. Both cervical and intrauterine inseminations of all ewes were then performed by laparotomy, independently of the estrus signal, with at least 250 million spermatozoa per each dose of 0.4 ml suspension. The following were the rates of pregnancy found: with CUE, 69.56% (n = 23) and 8.33% (n = 24) for the intrauterine and cervical routes of insemination respectively; with citrate-yolk extender, 85.71% (n = 21) and 21.74% (n = 23) for the intrauterine and cervical routes of insemination respectively. No statistical significance ($P>0.05$) has been found between values of pregnancy attained with suspensions of spermatozoa either in CUE or in citrate-yolk extender, in spite of the fact that the latter one gave higher pregnancy rates. Intrauterine insemination gave higher values of fertility ($P<0.05$) in comparison with the cervical insemination. It was possible to cool the ram semen for a period as long as 8 hours in citrate-yolk extender, when using intrauterine insemination, but the results were modest when using cervical insemination. The fertilization capability of cooled ram semen showed to be satisfactory if the semen is kept near the insemination site.

Key words: sheep, cooled semen, artificial insemination.

Introdução

São grandes as variações na taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado, mesmo quando se utilizam diluentes semelhantes. Esta variabilidade deve-se a vários fatores: LAPWOOD *et al.* (1972) observaram diferenças significativas entre inseminadores, carneiros, ejaculados do mesmo carneiro e momento de inseminação. LÓPEZ-BREA (1996) cita que a heterogeneidade das taxas de fertilidade se deva também a dose inseminante, qualidade dos espermatozóides, estro natural ou sincronizado, situação reprodutiva, idade, raça e condição corporal dos reprodutores e matrizes, intervalo entre o último parto e a inseminação, estação de inseminação, além do local de deposição do sêmen.

Geralmente, espermatozóides congelados ou refrigerados apresentam reduzida fertilidade após a inseminação cervical quando comparados ao sêmen fresco ou à inseminação intrauterina por laparoscopia. (MAXWELL e WATSON, 1996). Muitas tentativas têm sido feitas para superar a barreira cervical em ovelhas e alcançar o útero, tendo como objetivo, aumentar as taxas de parição após a inseminação com sêmen conservado. A técnica de laparoscopia é atualmente a forma mais utilizada de inseminação artificial intrauterina, apresentando bons resultados de fertilidade, porém, o alto custo dificulta seu uso em rebanhos comerciais.

No Brasil são poucos os trabalhos que retratam resultados de inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado (JOBIM *et al.*, 1987; CRUZ, 1994). Uma grande variedade de diluentes tem sido propostos para melhorar a fertilidade do sêmen refrigerado ovino. PETRUZZI *et al.* (1976) obtiveram bons resultados de motilidade quando refrigeraram sêmen ovino em diluentes a base de TRIS e citrato. BUTSWAT *et al.* (1992) verificaram motilidade 80% após 1 dia de conservação do sêmen no diluente CUE, utilizando a técnica de diálise. MILCZEWSKI (1999) verificou que os diluentes citrato-gema e Cornell University Extender apresentaram melhores resultados de preservação "in vitro" quando comparados aos diluentes TRIS-gema, CU-16, glicina-gema e leite UHT-gema. O objetivo deste trabalho foi verificar a taxa de prenhez em ovelhas inseminadas por via cervical e intrauterina com o uso de sêmen refrigerado por 8 horas a 5°C nos diluentes citrato-gema e Cornell University Extender (CUE).

Material e Métodos

Em cada inseminação artificial foi utilizado um homogeneizado de sêmen de 2 carneiros, de um total de 4 animais da raça Suffolk, com idade de 2 a 6 anos, previamente submetidos a exame andrológico. Os ejaculados foram colhidos mediante vagina artificial, sendo utilizados somente aqueles que apresentaram as seguintes condições mínimas: turbilhonamento 3 (1-5), motilidade progressiva 70% (0-100%), vigor 3 (1-5), 80% de espermatozóides normais e concentração espermática de 2,5 milhões/mm³. Após a avaliação, um ejaculado de cada 2 carneiros eram homogeneizados, divididos em 2 alíquotas e diluídos, na proporção de 1+3, nos diluentes CUE (FOOTE e BRATON, 1960) e citrato-gema (EVANS e MAXWELL, 1987). Os tubos de ensaio com sêmen diluído eram colocados em recipiente plástico contendo água e este conjunto era levado à caixa de isopor com gelo. A diminuição da temperatura de 30 para 5°C ocorreu em 2 horas. As inseminações ocorreram após 8 horas de conservação do sêmen a 5°C. Todas as ovelhas utilizadas para a inseminação foram submetidas ao exame ginecológico prévio por meio de espécule vaginal, sendo descartadas as que apresentavam constrição vaginal persistente ou catarro genital. O estro foi sincronizado utilizando-se pessários intravaginais impregnados com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), os quais permaneceram por 14 dias quando se administraram 500 UI de eCG e introduziram-se 5% de rufões junto às fêmeas. Todas as ovelhas foram inseminadas independente do aparecimento do estro. Foram inseminadas 91 ovelhas mestiças da raça Suffolk, nos meses de junho, julho de 1996 e março de 1997. Os animais estavam alojados em 2 Parques Municipais da Cidade de Curitiba (PR), apresentavam idade de 2 a 6 anos e escores da condição corporal entre 3 e 4. Quarenta e quatro ovelhas foram inseminadas por via intrauterina, 55 ± 1 horas após a retirada dos pessários. Utilizou-se a técnica de laparoscopia segundo KILLEN e CAFFERY (1982). A dose mínima inseminante foi de 125 milhões de espermatozóides, em volume de 0,2 ml, em cada corno uterino. As ovelhas foram divididas em 2 subgrupos, sendo 23 ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado em CUE e 21 inseminadas com sêmen refrigerado em citrato-gema. Outras 47 ovelhas foram inseminadas por via cervical, 49 ± 1 horas após a retirada dos pessários, sendo

empregada a técnica de inseminação cervical superficial, com aplicador modelo BARRETO MIES. A contenção das fêmeas inseminadas foi realizada mediante elevação do posterior sobre cavalete de 90,0 cm de altura e imobilização dos membros pélvicos por um auxiliar. Mediante espéculo tubular, localizava-se a abertura cervical e procedia-se a inseminação, permanecendo a ovelha, na mesma posição por mais um minuto. Nos animais que possuíam excesso de muco vaginal, este era retirado com o auxílio do espéculo. A dose mínima inseminante foi de 250 milhões de espermatozoides, em volume de 0,4 ml, por ovelha. As ovelhas foram divididas em 2 subgrupos, sendo 24 ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado em CUE e 23 ovelhas com sêmen refrigerado em

citrato-gema. O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultra-sonográfico abdominal, utilizando-se transdutor 3,5 MHZ, 60 dias após a inseminação artificial. Para a verificação das diferenças entre os grupos de ovelhas inseminadas, foram efetuadas comparações pelo Teste Exato de Fisher e Teste Qui Quadrado. Na comparação dos grupos, o nível de significância foi fixado em 5%.

Resultados e Discussão

As taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por via intra-uterina ou cervical com sêmen refrigerado diluído em CUE comparados com o sêmen diluído em citrato-gema são apresentados nas TABELAS 1 e 2.

TABELA 1 – TAXAS DE PRENHEZ DE OVELHAS INSEMINADAS POR VIA INTRA-UTERINA COM SÊMEN REFRIGERADO EM 2 DILUENTES POR 8 A 10 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C. CURITIBA (PR), 1999.

DILUENTES	OVELHAS INSEMINADAS (Nº)	OVELHAS GESTANTES (Nº)	OVELHAS GESTANTES (%)
CUE*	23	16	69,56 ^a
Citrato-gema	21	18	85,71 ^a
TOTAL	44	34	77,27

NOTAS: letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($P>0,05$).

* Cornell University Extender

Verificou-se maior número de ovelhas gestantes após inseminação com citrato-gema em relação ao CUE, tanto na via intra-uterina quanto na via cervical superficial, porém a diferença não foi estatisticamente significativa ($P>0,05$). Os resultados de prenhez no grupo de ovelhas inseminadas por via intra-uterina com sêmen refrigerado foram satisfatórios para os 2 diluentes testados. Apesar do diluente citrato-gema ter apresentado resultado 16,15% superior

em relação ao grupo inseminado com CUE, não houve diferença significativa ($P>0,05$).

A taxa de prenhez foi baixa nos grupos inseminados por via cervical superficial, nos 2 diluentes testados. A diferença no número de ovelhas gestantes de 8,33% para 21,74% no grupo inseminado com sêmen refrigerado em CUE e citrato-gema, respectivamente, demonstrou não haver diferença significativa ($P>0,05$) entre diluentes.

TABELA 2 – TAXAS DE PRENHEZ DE OVELHAS INSEMINADAS POR VIA CERVICAL COM SÊMEN REFRIGERADO EM 2 DILUENTES POR 8 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C. CURITIBA (PR), 1999.

DILUENTES	OVELHAS INSEMINADAS (Nº)	OVELHAS GESTANTES (Nº)	OVELHAS GESTANTES (%)
CUE*	24	02	8,33 ^a
Citrato-gema	23	05	21,74 ^a
TOTAL	47	07	14,89

NOTAS: letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($P>0,05$).

* Cornell University Extender

Considerando exclusivamente o local de deposição do sêmen, foi observada diferença estatística significativa entre os 2 grupos. Os resultados de prenhez do grupo de ovelhas

inseminadas pela via intra-uterina ($P<0,05$) foram superiores. Estes resultados confirmam os relatos de EPPLESTON *et al.* (1994) os quais afirmam que o índice de fertilidade

aumenta linearmente à medida que a inseminação se processa em maior profundidade no trato genital da ovelha. Segundo FUKUI e ROBERTS (1978), utilizando-se a laparoscopia não há diferença na fertilidade entre sêmen fresco e congelado, além de permitir o uso de uma dose inseminante menor, quando comparado a inseminação cervical, otimizando a utilização do doador do sêmen. A inseminação intra-uterina pode estender a vida útil do sêmen refrigerado para até 6 dias de estocagem (EVANS, 1987).

Levando-se em consideração esses relatos e os resultados obtidos, testes subseqüentes na inseminação intra-uterina com sêmen refrigerado poderão ser reproduzidos utilizando-se doses inseminantes menores e tempos maiores de conservação em relação aos utilizados neste experimento.

A inseminação cervical neste experimento revelou baixas taxas de prenhez. Segundo LÓPEZ-BREA (1996) os baixos resultados encontrados com o sêmen refrigerado nesta via de aplicação, chegam a comprometer a viabilidade do seu emprego. SOUZA *et al.* (1994) e SALAMON e MAXWELL (1995) trabalhando com sêmen congelado e SALAMON *et al.* (1977) trabalhando com sêmen refrigerado verificaram que os baixos índices de fecundação de ovelhas inseminadas por via cervical são atribuídos às dificuldades dos espermatozóides de serem transportados através do canal cervical e à diminuição da viabilidade espermática. Estas barreiras podem ser a causa da morte de grande número de espermatozóides resultando em quantidade espermática insuficiente para a fecundação. MAXWELL e WATSON (1996) sugerem que espermatozóides conservados apresentam trocas nas membranas semelhantes àquelas que ocorrem durante a capacitação e a reação do acrossoma, por isso requerem menos tempo de capacitação no trato genital feminino, e podem fertilizar oócitos prontamente, se depositados próximos ao local de ovulação, como ocorre na fertilização *in vitro*, tubárica ou intra-uterina. Para LUNSTRA e CHRISTENSON (1981), outra possibilidade para a baixa taxa de prenhez após a inseminação cervical com sêmen conservado é a utilização do tratamento progestágeno mais eCG, para a indução do cio, que acaba por promover um efeito nocivo no transporte, sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozóides, assim como induz aumento na mortalidade embrionária

quando comparado com ovelhas inseminadas em estro natural. Segundo EDEY (1969), além do efeito da sincronização, o aumento na mortalidade embrionária pode ocorrer devido aos processos de refrigeração ou congelamento do sêmen, os quais promovem o envelhecimento dos espermatozóides que, apesar de promoverem a fertilização, causam aumento no número de mortes de embriões.

Um melhor entendimento das trocas que ocorrem nos espermatozóides após o processo de estocagem, poderiam levar a um aumento na capacidade fertilizante. Mais estudos são necessários para revelar se a hipótese de que o estado de capacitação ou a viabilidade dos espermatozóides são afetados pela conservação do sêmen.

Conclusões

Verificou-se, neste experimento, que a conservação do sêmen ovino durante algumas horas pelo processo de refrigeração pode viabilizar o aumento do uso de bons reprodutores entre fazendas próximas, dispensando o uso da congelação do sêmen.

A capacidade de fertilização do sêmen refrigerado é satisfatória desde que seja depositado próximo ao sítio de fertilização, por isso, para a obtenção de altas taxas de prenhez torna-se necessária a utilização de inseminação artificial intra-uterina, uma vez que a via cervical superficial fornece baixos resultados de fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUTSWAT, I.S.; OSINOWO, O.A.; DIM, N.I. Studies on ram semen preservation at ambient temperatures by flow dialysis techniques. **Tropical Agriculture**, v.69, n.2, p.145-148, 1992.
- CRUZ, J.F. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido a temperatura de + 4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas de água de coco**. Fortaleza, 1994, 81 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.
- EDEY, T.N. Prenatal mortality in sheep: a review. **Animal Breeding Abstracts**, v.37, n.2, p.173-190, 1969.
- EPPLESTON, J.; SALAMON, S.; MOORE, N.W.; EVANS, G. The depth of cervical insemination and site of intra-uterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.211-225, 1994.
- EVANS, G. Semen Processing. In: REFRESHER COURSE FOR VETERINARIANS (96: 1987: Sydney). **Proceedings...** Sydney: The Post-Graduated Committee in Veterinary Science, 1987, p. 1-5.

- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Sydney, Butterworths, 1987, 194 p.
- FOOTE, R.H.; BRATTON, R.W. Survival of bovine spermatozoa stored at 5 and 25°C in extenders containing varying levels of egg yolk, glucose, glycine, glycerol, citrate, and others salts. **Journal of Dairy Science**, v.43, n.9, p.1322-1329, 1960.
- FUKUI, Y.; ROBERTS, E.M. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, v.10, n.5, p.381-386, 1978.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; MIES FILHO, A.; VIEIRA, J.M.S. Inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.11, n.4, p.163-167, 1987.
- KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.95, 1982.
- LAPWOOD, K.R.; MARTIN, I.C.A.; ENTWISTLE, K.W. The fertility of merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose or ribose. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.23, p.457-466, 1972.
- LÓPEZ-BREA, J.J.G. Inseminación artificial en ganado ovino. In: Curso Internacional de Reproducción Animal (19: 1996: Madrid). **Proceedings...** Madrid : INIA, 1996, p. 01-14.
- LUNSTRA, D.D.; CHRISTENSON, R.K. Fertilization and embryonic survival in ewes synchronized with exogenous hormones during anestrus and oestrus season. **Journal of Animal Science**, v.53, n.2, p.458-465, 1981.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.
- MILCZEWSKI, V. **Inseminação artificial ovina com sêmen refrigerado aplicado em diferentes vias**. Curitiba, 1999, 67 p. Tese de Mestrado, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná.
- PETRUZZI, V.; TARANTINI, S.; ROYCHOUDHURY, P.N. Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v.23, n.7, p.556-561, 1976.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C.; FIRTH, J.H. Fertilizing capacity of ram spermatozoa stored at 5°C. **Theriogenology**, v.8, n.4, p.200, 1977.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: II Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36, 1995.
- SOUZA, M.I.L.; LUZ, S.L.N.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P. Características morfológicas e penetrabilidade cervical visando a inseminação artificial em ovinos. **Ciência Rural**, v.24, n.3, p.591-595, 1994.