

INSEMINAÇÃO TRANSCERVICAL COM SÊMEN CONGELADO EM OVINOS¹

TRANSCERVICAL INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN IN SHEEP.

Maria Inês Lenz Souza² Sérgio Luis Nadal da Luz³ Paulo Bayard Dias Gonçalves⁴
Jairo Pereira Neves⁵

RESUMO

O presente experimento teve por finalidade verificar o efeito na prenhez de diferentes técnicas de inseminação cervical com sêmen congelado, em 234 ovelhas Corriedale, em cio natural. Utilizou-se sêmen congelado em peletes de três carneiros Suffolk e um Corriedale. Cento e trinta e seis ovelhas foram inseminadas por via cervical, com (60) e sem (76) tração cervical. Como grupo controle, noventa e oito ovelhas foram submetidas à inseminação laparoscópica. Para a análise do índice de prenhez, verificado através da ecografia, os graus de penetração foram classificados em cervical superficial e profundo. Considerando-se todas as ovelhas submetidas à inseminação cervical, obteve-se resultados de prenhez de 44,19% e 32,26%, respectivamente para maior e menor profundidade de deposição. A inseminação cervical sem tração resultou em 28,95% de prenhez, o que é estatisticamente inferior aos resultados observados por laparoscopia (57,14%; $p < 0,001$) e similares aos obtidos com tra-

ção cervical (45,00%). No entanto, a percentagem de prenhez foi semelhante entre a inseminação por tração cervical e laparoscópica. Os resultados são indicativos de que a inseminação com tração cervical proporciona resultados de prenhez análogos aos obtidos com a laparoscopia.

Palavras-chave: ovinos, inseminação artificial, sêmen congelado.

SUMMARY

The present study aimed to verify the effect of different cervical insemination techniques with frozen semen on pregnancy of 234 Corriedale ewes, in natural estrus. Frozen semen in pellets from three Suffolk and one Corriedale ram were used in this experiment. One hundred and thirty-six ewes were inseminated through the cervix, with (60) and without (76) cervical traction. As the control group, ninety-eight

¹ Este trabalho foi implementado com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

² Médico Veterinário, MS, Bolsa Recém-Mestre, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, 97119-900 - Santa Maria, RS, Fax (055) 226-1975.

³ Médico Veterinário, MS, Autônomo, Florianópolis, SC.

⁴ Médico Veterinário, Professor Adjunto, PhD, UFSM.

⁵ Médico Veterinário, Professor Titular, Doutor, UFSM, autor para correspondência.

ewes were submitted to laparoscopic insemination. Pregnancy rate was verified by ultrasound, the data were divided in superficial and deep penetration based in the degree that the catheter passed through the cervix. Considering the total number of ewes submitted to cervical insemination, the pregnancy rate was 44.19% and 32.26% for deep and superficial cervical deposition of the semen, respectively. The cervical insemination without traction resulted in 28.95% of pregnancy, which is statistically lower to that observed by laparoscopic insemination (57.14%; $p < 0.001$) and similar to the results obtained with cervical traction (45.00%). However, the percentage of pregnancy was similar between the insemination by cervical traction and laparoscopy. In conclusion, the results suggest that pregnancy rate of ewes, in natural estrus, is similar when either cervical traction or laparoscopy is used to inseminate with frozen semen.

Key words: ovine, artificial insemination, frozen semen.

INTRODUÇÃO

O conhecimento de que a aplicação do sêmen descongelado no lume uterino proporciona resultados de fecundação satisfatórios foi relatado anteriormente em diversos experimentos (LIGHTFOOT & SALAMON, 1970; LOGINOVA & JELTOBTUCH, 1972; LINGE, 1974; OLAFSSON, 1979).

A deposição intrauterina do sêmen descongelado pela via cervical foi testada por ANDERSEN et al. (1973), com resultados de 89,0% de prenhez nas ovelhas em que foi alcançada a deposição uterina contra 45,0% com a cervical profunda. FUKUI & ROBERTS (1976) obtiveram percentuais de parição de 50,9% na deposição uterina comparados com 19,7% após inseminação cervical profunda.

Como alternativa para a utilização do sêmen congelado, KILLEN & CAFFERY (1982) desenvolveram a técnica da IA intrauterina por laparoscopia, que permitiu a obtenção de resultados semelhantes aos alcançados com monta natural ou inseminação com sêmen fresco, utilizando doses reduzidas de sêmen, mas que requer altos investimentos e custos com mão-de-obra, equipamentos e hormônios (EVANS, 1988).

Inseminando ovelhas pelas vias transcervical às 48 ou 55 horas após a retirada dos pessários vaginais e pela técnica de laparoscopia, HALBERT et al. (1990) alcançaram 50,0%, 68,0% e 70,0% de prenhez, respectivamente. A aplicação laparoscópica de sêmen congelado em ovelhas com cio natural, foi experimen-

tada inicialmente por PERDIGÓN et al. (1987) e AZZARINI & VALLEDOR (1987) propiciando 64,5% e 51,0% de prenhez. Posteriormente, LUZ (1991) obteve 62,1% em ovelhas Corriedale.

O incremento da população espermática a nível cervical, por meio de dupla inseminação, com intervalos variados, foi investigado por diversos autores (LOGINOVA & JELTOBTUCH, 1972; MIES FILHO et al., 1984), mas os resultados foram discrepantes.

Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito de diferentes técnicas de inseminação cervical na prenhez de ovelhas em cio natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores de sêmen foram utilizados 3 carneiros Suffolk e 1 carneiro Corriedale. O sêmen foi colhido com vagina artificial^a, imediatamente colocado em banho-maria a 30°C e analisado quanto ao volume, movimento de massa (turbilhonamento), movimento progressivo e concentração espermática, de acordo com EVANS & MAXWELL (1987). Somente os ejaculados com os seguintes padrões mínimos foram aproveitados: volume de 0,5ml, movimento de massa de duas cruzes (++-), movimento progressivo de 65% e concentração espermática de 3,0 milhões de espermatozoides por mm³.

Para o congelamento do sêmen empregou-se a técnica de EVANS & MAXWELL (1987), com um diluidor à base de Tris/glicose/ácido cítrico/gema de ovo/glicerol, na diluição 1+3. Cada pelete resultou em um volume aproximado de 0,16ml e uma concentração aproximada de 100 milhões de espermatozoides.

Os peletes foram descongelados em um tubo de ensaio, em banho-maria a 38°C, tendo-se o cuidado de agitar o tubo até o total descongelamento. Para a inseminação artificial (IA) cervical, o sêmen foi aspirado com uma mini-palhetab (0,25ml) e, esta, introduzida no cateter de aplicação. O grupo de ovelhas que recebeu o sêmen diretamente no útero por laparoscopia, foi inseminado com o auxílio de uma pipeta de vidro. Aproveitou-se somente as amostras com um mínimo de 40,0% de movimento progressivo.

A detecção de cio foi efetuada com rufiões da raça Corriedale, previamente testados, na proporção de 5%. Antes de serem colocados com as mesmas, eles receberam tinta colorida (pó xadrez + óleo queimado) na região esternal, de acordo com o manejo da IA, permanecendo com as fêmeas das 18 horas de um dia até às 7 horas do dia seguinte.

Foram utilizadas 234 ovelhas da raça Corriedale, com idade entre 2 e 4 anos, identificadas indivi-

dualmente, saúde geral, genital e estado nutricional satisfatórios. A IA foi realizada em três grupos de ovelhas com cio natural, à medida em que fossem apresentando-se em cio, com diferentes formas de deposição de sêmen, na seguinte ordem: por laparoscopia, por via cervical sem e com tração do cérvix.

IA sem tração do cérvix:

Foram inseminadas 76 ovelhas com duas aplicações de sêmen, uma logo após o aparte e outra após um intervalo de 8 horas. Os animais foram contidos num brete de IA com o posterior elevado. A condição de estro foi confirmada pela observação do quadro vaginal, caracterizado pela hiperemia das mucosas e presença de muco, com um espécúlo tubular com fonte de luz. O sêmen foi aplicado através de um aplicador metálico segundo Cassou^c. Este foi introduzido até a abertura do orifício cervical externo e submetido a uma leve pressão e movimentos laterais, com o objetivo de provocar uma progressão através dos anéis cervicais no sentido cranial. O grau de penetração do aplicador foi avaliado em cervical superficial e profundo, por uma única pessoa, de acordo com a profundidade alcançada, em um tempo máximo de 3 minutos.

IA com tração do cérvix:

Foram inseminadas 60 ovelhas, logo após o aparte, com uma única aplicação. A contenção e a avaliação da condição estral foram realizadas conforme a descrição no item anterior. A aplicação do sêmen foi procedida após prévia fixação e retração da região adjacente do orifício cervical com uma pinça segundo Cassou. O sêmen foi depositado com um aplicador metálico tipo Cassou. O grau de penetração foi avaliado com o mesmo critério descrito anteriormente.

Laparoscopia:

A inseminação laparoscópica foi implementada em 98 ovelhas, a partir do momento da detecção do cio (em média 6 horas após). Para a contenção foram utilizadas mesas especiais para este fim, nas quais as ovelhas ficavam em decúbito dorso-obliquo e ângulo de 60 graus, com a parte caudal mais elevada, para o deslocamento das vísceras no sentido cranial. A região das punções foi tosquiada, submetida à antissepsia com um produto à base de iodo^d e anestesiada com 6ml de xylocaína a 2%^e. Com o auxílio de um laparoscópio Storz^f foram inseridos dois trocartes, 3 a 4cm lateralmente à linha média, um de cada lado, 5 a 7cm cranialmente ao úbere. O trocarte da esquerda foi

utilizado para a insuflação de ar (CO₂) e colocação do telescópio. No outro, aplicou-se um manipulador para facilitar o posicionamento do útero e, posteriormente, introduziu-se uma pipeta de vidro com o sêmen, com a qual procedeu-se a punção, na curvatura maior e porção medial de cada corno uterino. Logo após a IA foi colocado um repelente^g no local das punções.

O diagnóstico de gestação de todas as ovelhas foi realizado por ultra-sonografia, 33 dias após o término do período de IA. A verificação das diferenças entre os grupos de inseminação quanto ao diagnóstico de gestação foi realizada através do teste qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa estatístico SAS (1988). Os resultados dos diferentes tratamentos foram comparados utilizando a análise de contraste pelo método dos mínimos quadrados ponderados no PROC CATMOD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os baixos índices de fecundação de ovelhas inseminadas por via cervical, com sêmen congelado, têm sido atribuídos às dificuldades dos espermatozoides serem transportados através do canal cervical e à diminuição da viabilidade espermática. Estas barreiras podem ser a causa da morte de um grande número de espermatozoides, resultando em uma quantidade espermática insuficiente para uma fecundação com índices satisfatórios. Experimentos têm indicado, com resultados inconstantes, que as percentagens de prenhez com sêmen congelado tendem a aumentar conforme aumenta a profundidade cervical do cateter de IA (LIGHTFOOT & SALAMON, 1970; LOGINOVA & JELTOBTUCH, 1972; SMITH et al., 1975; FUKUI & ROBERTS, 1976). Contrário a esta hipótese, os dados das inseminações artificiais, independentes de serem realizadas com ou sem tração cervical, demonstram que o número de ovelhas prenhas obtido através da IA superficial ou profunda foi estatisticamente similar neste estudo (Tabela 1).

A deposição intrauterina do sêmen é uma alternativa para transpor a barreira cervical. Porém, pesquisadores têm tentado superar esta barreira através de diferentes métodos de IA por via cervical, e alguns têm descrito elevadas percentagens de prenhez com sêmen congelado por esta via com a deposição intrauterina (ANDERSEN et al., 1973; LINGE, 1974; FUKUI & ROBERTS 1976; OLAFSSON, 1979; HALBERT et al., 1990). No entanto, em função da anatomia cervical, torna-se muito difícil uma definição clara de que o sêmen foi depositado diretamente no útero e não apenas profundamente no canal cervical. No pre-

Tabela 1 - Percentuais de prenhez obtidos em ovelhas Corriedale inseminadas por via cervical com sêmen congelado, segundo as profundidades de penetração superficial e profunda.

PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO CERVICAL	OVELHAS		
	INSEMINADAS	PRENHES	
	n	n	%
Superficial	93	30	32,26
Profunda	43	19	44,19
TOTAL	136	49	44,47

Tabela 2 - Percentuais de prenhez obtidos em ovelhas Corriedale inseminadas por via cervical com sêmen congelado, com e sem tração do cérvix, de acordo com as profundidades de penetração superficial e profunda

PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO CERVICAL	IA SEM TRAÇÃO			IA COM TRAÇÃO		
	INS. PRENHES			INS. PRENHES		
	n	n	%	n	n	%
Superficial	62	18	29,03	31	12	38,71
Profunda	14	04	28,57	29	15	51,72
TOTAL	76	22	28,95	60	27	45,00

sente experimento, verificou-se impossibilidade desta afirmação, devido à tortuosidade e consistência do canal cervical. Por este motivo, a designação inseminação cervical profunda possivelmente seja mais adequada que deposição intrauterina.

A manipulação do cérvix em excesso na tentativa da deposição intrauterina do sêmen pode acarretar em estresse e traumatismo, o que seria uma possível causa de diminuição da fecundação ou do desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, a tentativa de duas aplicações de sêmen com intervalo de 8 horas não tem demonstrado vantagens sobre uma única aplicação, principalmente devido ao estresse causado pela demasiada manipulação cervical (MIES FILHO et al., 1984). Neste experimento, não foi observada uma relação entre a profundidade de penetração nas IA cervicais com os índices de prenhez obtidos, mesmo quando os resultados foram divididos em inseminações com e sem tração cervical ($p > 0,05$; Tabela 2). A tração do cérvix tem sido indicada como um meio para facilitar a introdução do cateter de inseminação no canal cervical e aumentar os índices de prenhez quando for utilizado sêmen congelado, facilitando o transporte espermático (MATTNER, 1963; MATTNER & BRADEN, 1969; LIGHTFOOT & SALAMON, 1970; VISSER, 1974; FUKUI & ROBERTS, 1976; HALBERT et al., 1990).

A tração cervical proporcionou um incremento no índice de prenhez, ainda que não significativo, e este fato pode ter sido em consequência da fixação do cérvix ter facilitado a introdução do cateter de inseminação no canal cervical, diminuindo a possibilidade de lesão deste segmento do útero.

Ao investigar os índices de prenhez das inseminações realizadas por via cervical, com ou sem

tração do cérvix, e por via laparoscópica tornou-se evidente a superioridade dos resultados obtidos pela utilização da tração cervical. As ovelhas submetidas à laparoscopia alcançaram 57,14% de prenhez. Este percentual foi superior ao obtido pelo método de aplicação cervical sem tração ($p < 0,001$) e semelhante ao cervical com tração ($p > 0,05$; Tabela 3). Com a técnica de inseminação laparoscópica, utilizada como controle neste experimento, foi obtido um índice de prenhez que se aproximou aos que vêm sendo descritos com a mesma metodologia (AZZARINI & VALLEDOR, 1987; PERDIGÓN et al., 1987; LUZ, 1991). Conside-

Tabela 3 - Prenhez de ovelhas Corriedale inseminadas com sêmen congelado em pelete, por via cervical, com e sem tração, e por laparoscopia.

MÉTODO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	OVELHAS		
	INSEMINADAS	PRENHES	
	n	n	%
Cervical sem tração	76	22	28,95 ^a
Cervical com tração	60	27	45,00 ^{ab}
Laparoscopia	98	56	57,14 ^b
TOTAL	234	105	44,47

^{AB} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($X^2 = 13,31$; $p = 0,003$; GL = 1)

rando-se que a inseminação por laparoscopia tem sido o melhor método para vencer a barreira cervical e que a fecundação obtida através da IA com tração cervical é similar àquela alcançada pela inseminação laparoscópica, pode-se supor que qualquer redução nos índices de prenhez seja devido, principalmente, por uma diminuição da viabilidade do sêmen congelado e secundariamente em consequência da anatomia cervical da ovelha.

Com isso, abre-se uma nova alternativa para aplicação do sêmen congelado, em ovelhas, pela via cervical ao invés da laparoscopia proposta por KILLEN & CAFFERY (1982), BONIFACINO et al. (1987), EVANS & MAXWELL (1987) e LUZ (1991). A laparoscopia é uma técnica que vem sendo utilizada com relativo sucesso mas, para a maioria dos rebanhos, torna-se inviável devido aos custos com pessoal técnico e equipamentos (EVANS, 1988; NEVES, 1990). A inseminação cervical requer apenas a utilização de instrumental para a aplicação do sêmen e um técnico treinado, reduzindo de forma considerável os custos. Assim, a inseminação com sêmen congelado pode ser realizada em larga escala, permitindo estender os benefícios da IA a um maior número de ovelhas em relação à laparoscopia. Porém, os cuidados com este tipo de inseminação devem ser focalizados no manuseio do cateter e da pinça na genitália da fêmea, com a finalidade de reduzir ao mínimo o tempo, o estresse e os eventuais traumatismos.

Experimentos estão em fase de desenvolvimento para determinar a repetibilidade dos resultados e a eficácia da técnica de IA com deposição do sêmen congelado utilizando a tração cervical em relação à IA tradicional com sêmen fresco. Estes experimentos estão sendo desenhados para determinar outros fatores inerentes ao sêmen e a técnica de aplicação, considerando-se a anatomia cervical da ovelha.

CONCLUSÃO

A utilização da inseminação artificial, com sêmen congelado e tração cervical permitiu obter resultados de prenhez semelhantes aos conseguidos através da laparoscópica.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- H. HAUPTNER - Kuller straBe, 38/44 - Berlim.
- Réf. UA 006 - 10, Rue Clémenceau, B.P. 61300 L'Aigle - France.
- Réf. UA 006 - 10, Rue Clémenceau, B.P. 61300 L'Aigle - France.
- BIOCID - Lab. Pfizer Ltda., Rodov. Pres. Dutra, Km 225 - Guarulhos - SP

- Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda. - Av. Mário Lopes Leão, 1500 - Santo Amaro - SP.
- H-STRATTNER & Cia. Ltda. - Rua Ricardo Machado, 904 - São Cristóvão - Rio de Janeiro - RJ.
- BIBESOL - Rhodia Merieux Veterinária Ltda., Fazenda São Francisco - Paulínea - SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, V.K., AAMDAL, J., FOUIGNER, J.A. Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. *Zuchthygiene*, v. 8, p. 113-118, 1973.
- AZZARINI, M., VALLEDOR, F. Inseminacion intrauterina con semen congelado en ovejas. *Ovinos y Lanos*, Montevideo, 1987. p. 7-14. Boletim Técnico, 6.
- BONIFACINO, L.A., PERDIGÓN, F., NEVES, J.P., et al. Inseminação intrauterina por laparoscopia em ovinos com a utilização de sêmen congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1987, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987, v. 1, 106 p. p. 102.
- EVANS, G. Current topics in artificial insemination of sheep. In: CSIRO, **Controlled Breeding in Sheep**. Austrália: J.K. Findlay, 1988. p. 103-116.
- EVANS, G. & MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Sydney: Butterwoths, 1987. 194p.
- FUKUI, Y., ROBERTS, E.M. Studies of non-surgical intrauterine insemination of frozen pelleted semen in the ewe. In: THE INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1976, Cracow, **Proceedings...** Cracow, 1976, p. 991-993.
- HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., et al. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, v. 33, n. 6, p. 1231-1243, 1990.
- KILLEN, I.D., CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Aust Vet J*, Austrália, v. 59, p. 95, 1982.
- LIGHTFOOT, R.J., SALAMON, S. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. II. The effects of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. *J Reprod Fert*, v. 22, p. 399-408, 1970.
- LINGE, F. Faltforsok med djupfryst sperma. *Farskotsel*, v. 54, n. 10, p. 13, 1974.
- LOGINOVA, N.V., JELTOBTUCH, N.A. Viability of the frozen ram semen in different parts of the genital tract. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION & AI, 1972, Munich, **Proceedings...** Munich, 1972, v. 2, p. 1507-1510.
- LUZ, S.L.N. **Inseminação intrauterina por laparoscopia em ovinos**. Santa Maria-RS. 1991. 58 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. 1991.

- MATTNER, P.E. Spermatozoa in the genital tract of the ewe. III. The role of spermatozoan motility and of uterine contractions in transport. **Aust J Biol Sci**, Austrália, v. 16, p. 877-884, 1963.
- MATTNER, P.E., BRADEN, W.H. Comparison of distribution of motile and imotile spermatozoa in the ovine cervix. **Aust J Biol Sci**, Austrália, v. 22, p. 1069-1070, 1969.
- MIES FILHO, A., DUTRA, J., ENDLER, J.O., et al. Fertilidade e prolificidade de ovelhas inseminadas com sêmen congelado na primavera. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1984, Belo Horizonte, MG, **Anais...**, Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1984, 401p. p.324-331.
- NEVES, J.P. Novas técnicas de inseminação artificial em ovinos. In: **Caprinocultura e Ovinocultura**. Piracicaba. Soc. Bras. de Zootecnia, 1990. p. 57-67.
- OLAFSSON, T. Intrauterin inseminasjon av soyermed dypfrosset saed. **Nord Vet Med**, v. 31, p. 297-301, 1979.
- PERDIGÓN, F., SIENRA, I., CARBO, A. Inseminacion intrauterina por laparoscopia con semen congelado en celo natural en ovinos. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIA, 1987, Montevideo, Uruguai, **Resumos...** Montevideo, 1987. **SAS. User's Guide**. USA: SAS Institute Inc., 1988. p.191-282.
- SMITH, J.F., BOYS, P.T.S., DROST, H., et al. A.I. of sheep with frozen semen. **Anim Prod**, v. 35, p. 71-77, 1975.
- VISSER, D. Recent advances in the deep-freeze preservation of ram semen. **S Afr J Anim Sci**, África do Sul, v. 4, p. 275-288, 1974.