

EFEITO DA ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL OVINO AO SÊMEN DESCONGELADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE OVELHAS PELA VIA CERVICAL SUPERFICIAL¹

Odilei Rogerio Prado², Alda Lúcia Gomes Monteiro³, Guilherme de Medeiros Bastos⁴, Carlos Henrique Kulik⁵, Thiago Augusto Cruz⁶

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pelo CNPq. ²Doutorando do PPGCV/UFPR – Curitiba-PR. E-mail: orpradovet@gmail.com; ³Departamento de Zootecnia – LAPOC/UFPR – Curitiba – PR. E-mail: alda.ufpr@gmail.com; ⁴Departamento de Medicina Veterinária – UNICENTRO – Guarapuava-PR. E-mail: gmbastos2004@yahoo.com.br; ⁵Graduando em Zootecnia/UFPR – Curitiba-PR. E-mail: henriquekulik81@yahoo.com.br; ⁶Graduando em Zootecnia/UFPR – Curitiba-PR. E-mail: augustocruz@zootecnista.com.br

Resumo - O objetivo foi avaliar a o efeito da adição de plasma seminal (PS) ao sêmen ovino descongelado sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo (IATF) pela via cervical superficial. Foram inseminadas (IA) 136 ovelhas multiparas, divididas em três tratamentos: T1: IA com sêmen descongelado acrescido de PBS (SD+PBS); T2: IA com SD acrescido de plasma seminal (SD+OS); T3) IA com sêmen fresco diluído em PBS (SFD+PBS). No dia 0, cada ovelha recebeu um pessário vaginal impregnado com de 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP). No dia 12, os pessários foram removidos e cada ovelha recebeu (IM) 400 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e 37,5 µg de Cloprostenol Sódico . A IATF foi realizada entre 54 a 60 horas após a retirada dos pessários. Não houve diferença ($p>0,05$) na taxa de prenhez entre as ovelhas inseminadas com sêmen descongelado acrescido ou não com plasma seminal (7,0% versus 4,3%, respectivamente). As ovelhas inseminadas com SFD+PBS apresentaram maior ($p<0,05$) taxa de prenhez (50,0 %) em comparação aquelas inseminadas com SD+PS (7,0%) e SD+PBS (4,3%).. A adição de plasma seminal ovino ao sêmen descongelado não incrementa a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas pela via cervical superficial.

Palavras-Chave: inseminação cervical superficial, ovinos

INFLUENCE OF SEMINAL PLASMA ADDITION ON THAWED-FROZEN RAM SEMEN IN ARTIFICIAL INSEMINATION OF EWES IN THE BEGINNING OF CERVICAL

Abstract - The aim was to evaluate the effect of seminal plasma (SP) addition on thawed-frozen ram semen in the pregnancy rate of fixed time cervically inseminated (FTAI) ewes. One hundred and thirty six multiparous ewes were artificially inseminated (AI), divided into three treatments: T1: AI with frozen-thawed semen supplemented with PBS (FT+PBS), T2: IA with frozen-thawed semen supplemented with SP(FT+SP), T3) AI with fresh semen diluted in PBS (FS+PBS) . On day 0, each ewe received a vaginal pessary containing 60 mg of medroxiprogesterone acetate (MPA). On day 12, pessaries were removed and each ewe received (IM) 400 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 37.5 µg of sodium cloprostenol. The FTAI were performed among 54 and 60 hours after pessaries removal. There was no difference ($p>0.05$) in the pregnancy rate between ewes inseminated with frozen-thawed semen supplemented or not to SP(7.0% versus 4.3%, respectively). Ewes inseminated with FS+PBS (T3) resulted

in higher ($p < 0.05$) pregnancy rate (50.0%) compared those inseminated with FT+SP (T1; 7.0%) and FT+PBS (T2; 4.3%). The addition of ram seminal plasma to frozen-thawed semen does not increase the pregnancy rate of ewes inseminated in the beginning of cervical.

KeyWord: cervical insemination, ovine

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado é uma biotecnologia reprodutiva que vem sendo aplicada em rebanhos comerciais e de elite de ovinos, objetivando melhoria genética dos animais, sem a necessidade de transporte dos animais, além de permitir que programas de cruzamento possam ser desenvolvidos, utilizando raças de ovelhas que não são adaptadas ao clima dos trópicos. No entanto, o resultado de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen congelado pela via cervical superficial geralmente é baixo. Alguns fatores são descritos como limitadores, dentre eles a anatomia do colo do útero (cérvix) da ovelha. Esta estrutura longa é descrita como um órgão fibroso tubular, composto predominantemente por tecido conjuntivo, tortuoso por apresentar de 4 a 7 anéis cervicais e freqüentemente desalinhados, dificultando a introdução de pipetas de inseminação pela via cervical além do primeiro anel (Kershaw et al., 2005). A baixa resistência do sêmen de carneiro ao congelamento (Rabassa et al., 2007) é descrito como outro fator limitante da técnica em rebanhos comerciais.

O uso de IA com sêmen fresco ou refrigerado quando comparado com sêmen congelado, apresenta maiores chances de popularização, por requerer técnicas menos sofisticadas de deposição do sêmen no genital feminino (Bicudo et al., 2005). Outra consideração importante é que o sêmen descongelado via cervical não tem proporcionado resultados satisfatórios de prenhez, em virtude de falhas no transporte ou alterações bioquímicas e moleculares das células submetidas ao processo de congelamento e descongelamento, ou ainda na sobrevivência dos espermatozoides (Evans & Maxwell, 1990). A baixa fertilidade com sêmen descongelado na IA cervical se dá principalmente pelo aumento do número de células capacitadas e acrossoma reagido, resultantes do processo de diluição, congelação e descongelação (Salamon & Maxwell, 2000).

Com o propósito de melhorar a viabilidade do sêmen congelado para posterior utilização em inseminações pela via cervical, pesquisas têm sugerido a adição de plasma seminal após o descongelamento. Segundo Kirkwood et al. (2008), quando o plasma seminal é adicionado ao sêmen

descongelado, este interfere na fisiologia do espermatozóide, impedindo a capacitação precoce e aumentando sua vida fértil, além de resultar em maior reservatório de espermatozoides dentro do oviduto, alcançando assim o tempo de ovulação e tornando-os capazes de associar-se as células epiteliais do oviduto, para proporcionar maiores taxa de fertilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de plasma seminal ao sêmen ovino descongelado sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo pela via cervical superficial.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade privada de produção de ovinos, na região de Londrina-PR, entre abril e maio de 2011. Foram utilizadas 136 ovelhas multíparas cruza Texel, com escore de condição corporal médio de 2,5 (1 a 5), e mantidas em pastagem de Aruana, sal mineral e água, comprovadamente vazias por exame de ultrassonografia transretal. Foram aplicados os seguintes tratamentos: T1) inseminação artificial cervical (IAC) com sêmen descongelado (SD) e adição de solução tampão fosfato salino (PBS) (IAC/SD+PBS; n=49); T2) IAC com SD e adição de plasma seminal ovino (IAC/SD+PS; n=43); T3) grupo controle: IAC com sêmen fresco diluído (SFD) em PBS (IAC/SFD; n=44). Para a sincronização deaios, utilizou-se o protocolo hormonal com aplicação de pessários intravaginais impregnados com de 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) e mantidas por 12 dias. Na remoção dos pessários, aplicou-se (IM) 400 UI de Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG; Novormon®) e 37,5 µg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®). A manifestação de cio foi monitorada com a utilização de dois rufiões vasectomizados, a partir da retirada das esponjas até o momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), realizada entre 54 a 60 horas após a retirada dos pessários. O sêmen utilizado nos três tratamentos foi obtido de um mesmo carneiro da raça Texel com fertilidade comprovada por avaliação andrológica e colhido por meio de vagina artificial. Para congelação o sêmen foi diluído (1:2; sêmen:dilúente – Bovimix®, Nutricell) e envasado em palhetas de 0,25 mL com concentração de 240 x 106 e congelados

automaticamente na máquina TK3000 SUPER® utilizando o protocolo (P3.S2) descrito pelo fabricante, e posteriormente armazenados em botijão de sêmen contendo nitrogênio líquido até o dia da IATF. O plasma seminal ovino foi coletado de três rufões vasectomizados, por meio de vagina artificial, centrifugado a 1500 g por 10 minutos, colhido o sobrenadante e estocado a -20°C até a adição ao sêmen descongelado no momento da inseminação cervical. Na data da inseminação as palhetas eram descongeladas individualmente pela imersão em água a 37°C por 30 segundos, e o conteúdo liberado no interior de um tubo de ensaio (mantido no banho-maria a 37°C) contendo igual volume (0,25 ml) de PBS ou plasma seminal, conforme o tratamento. Após homogeneização, o volume total de 0,5 ml (sêmen descongelado + PBS ou plasma seminal) foi novamente acondicionado em duas palhetas de 0,25 ml, sendo as duas utilizadas para inseminar cada ovelha dos tratamentos T1 e T2. Para as ovelhas inseminadas via cervical superficial com sêmen fresco diluído (grupo controle – T3), o sêmen foi colhido com vagina artificial, diluído na proporção de 1:2 (sêmen:PBS) e colocado em tubo de ensaio mantido em banho-maria a 37°C com igual volume de PBS (diluição final 1:4; sêmen:PBS). No momento da inseminação eram envasadas duas palhetas de 0,25 ml, e as duas (0,5 ml) destinadas ao tratamento T3. A inseminação artificial cervical foi realizada utilizando o aplicador de sêmen de ovinos/caprinos da IMV®, com as ovelhas contidas e inclinadas com o posterior sobre um cavalete de madeira. Após higiene da vulva, com auxílio de espelho vaginal e lanterna, visualizava-se a cérvix, posicionava-se o aplicador na entrada do canal cervical e administrava-se o conteúdo total de duas palhetas inseminantes. Decorridos 30 dias após a inseminação, foi realizado o diagnóstico de gestação por ultra-sonografia transretal (Mindray, dotado de transdutor linear de 5 MHz), para determinação da taxa de prenhez. A análise estatística dos dados foi realizada por regressão linear dicotômica ($p < 0,05$), utilizando o pacote estatístico R versão 2.10.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de plasma seminal ao sêmen descongelado (Tabela 1) não proporcionou diferença significativa ($p > 0,05$) na taxa de prenhez de ovelhas inseminadas via cervical superficial, quando comparado ao tratamento que não recebeu plasma. Com este resultado confirma-se a inviabilidade de utilização de sêmen descongelado pela via cervical superficial, em virtude da baixa taxa de fertilidade das ovelhas, como encontrado por outros autores (Salamon & Maxwell, 2000), mesmo

quando da adição de plasma seminal.

Tabela 1. Percentual de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo (IATF) pela via cervical, utilizando sêmen descongelado com adição de PBS (SD+PBS), sêmen descongelado com adição de plasma seminal (SD+PS) e sêmen fresco com adição de PBS (SF+PBS).

Tipo de semên	N total	Prenhez (n)	Prenhez (%)	p-valor
SD+PBS	49	2	4,3b	$p < 0,001$
SD+PS	43	3	7,0b	
SF+PBS	44	22	50,0a	

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem ao nível de ($p < 0,05$) a 5%.

O volume inseminante total (0,5ml) pode ter influenciado negativamente a taxa de prenhez dos tratamentos com sêmen descongelado pela via cervical superficial, por aumentar o volume líquido em relação à concentração espermática, proporcionando maior refluxo seminal no momento da inseminação e diminuindo a quantidade de espermatozóides depositados no primeiro anel cervical. O congelamento de doses inseminantes com concentrações maiores de espermatozóides poderiam contribuir para melhoria dos resultados de prenhez, além de diminuir esta problemática.

Para estudos futuros, sugere-se avaliar a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen descongelado com adição de plasma seminal em porções mais profundas da cérvix. Isso poderia alavancar a viabilidade da técnica utilizando-a sêmen descongelado.

A taxa de prenhez das ovelhas inseminadas via cervical superficial com sêmen fresco diluído foi superior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos com a mesma técnica, confirmando a indicação deste tipo de sêmen, quando a inseminação for cervical.

CONCLUSÕES

A adição de plasma seminal ao sêmen ovino descongelado não incrementa a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas pela via cervical superficial.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Projetos: 574674/2008-0 e 559182/2010-4), a Cooperativa Coopercapanna e ao Médico Veterinário Ricardo Luca pela concessão dos animais para a pesquisa.

REFERÊNCIAS

BICUDO, S.D., AZEVEDO, H.C., SILVA MAIA, M.S., SOUSA, D.B., RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.33 (supl 1), p.127-130, 2005.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 191p. 1990.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; INGRAM, K.; LEETHONGDE E, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R.J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225-1235, 2005.

KIRKWOOD, R.N., VADNAIS, M.L., ABAD, M. Practical application of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 70, p. 1364-

1367, 2008.

RABASSA, V.R., TABELÃO, V.C., PFEIFER, L.F.M., SCHNEIDER, A. ZIGUER, E.A., SCHOSSLER, E., SEVERO, N.C., DEL PINO, F.A.B., CORRÊA, M.N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.1, p.127-133, 2007.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.