

RENAN DENADAI

***Inseminação Artificial com sêmen fresco e sua
Aplicabilidade como Biotecnologia da
Reprodução na Espécie Ovina***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: *Prof. Titular Sony Dimas Bicudo*

Botucatu
2009.

RENAN DENADAI

***Inseminação Artificial com sêmen fresco e
sua Aplicabilidade como Biotecnologia da
Reprodução na Espécie Ovina***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Reprodução Animal
Preceptor: *Prof. Titular Sony Dimas Bicudo*

Coordenador de Estágios: *Prof. Ass. Dr. Francisco José Teixeira Neto*

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: APARECIDA REGINA DENADAI DA SILVA

Denadai, Renan.

Inseminação artificial com sêmen fresco e sua aplicabilidade como biotecnologia da reprodução na espécie ovina / Renan Denadai. – Botucatu, 2009

Trabalho de conclusão (bacharelado – Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Preceptor: Sony Dimas Bicudo

1. Ovino- Reprodução 2. Inseminação Artificial

Palavras-chave: Ovino; Sêmen fresco; Inseminação artificial

EPIGRAFE

**“O amor é a força mais abstrata, e também a mais potente, que há no mundo.” (Mahatma Gandhi)
Eu amo o que eu escolhi fazer...**

RESUMO

Com o crescente desenvolvimento da ovinocultura brasileira o produtor viu-se obrigado a atingir melhores índices produtivos. A utilização da inseminação artificial vem se mostrando importante ferramenta biotecnológica da reprodução animal. Dentre as diversas técnicas existentes, a inseminação cervical superficial com sêmen fresco vem demonstrado taxas de fertilidade entre 70 e 80 % (AISEN, 2008), além da sua aplicabilidade, por não exigir equipamentos sofisticados nem mão de obra altamente especializada para sua implementação, gerando uma maior possibilidade no seu emprego para maximizar a reprodução e maior disseminação de material genético superior na propriedade. O presente trabalho objetiva abordar os aspectos da inseminação artificial com sêmen fresco na espécie ovina e sua aplicabilidade em rebanhos comerciais como ferramenta biotecnológica da reprodução assistida.

Palavras-chaves: Ovinos, Sêmen Fresco, Inseminação Artificial

ABSTRACT

With the increasing development of the Brazilian sheep production, the producer was forced to achieve higher production rates. The use of artificial insemination has been shown as an important biotechnological tool in animal breeding. Among the various existing techniques, the superficial cervical insemination with fresh semen is demonstrating fertility rates between 70 and 80% (AISEN, 2008), in addition to its applicability, it does not require sophisticated equipment or manpower to highly specialized implementing these plans greater possibility in your job to maximize reproduction and greater dissemination of superior genetic material on the property. This study aims to address aspects of artificial insemination with fresh semen in sheep and its applicability in commercial herds biotechnology as a tool in assisted reproduction .

Key words: Sheep, Fresh Semen, Artificial Insemination

SUMÁRIO

Resumo	6
<i>Abstract</i>	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Coleta e avaliação do sêmen ovino.....	10
2.2 Inseminações artificial em ovinos.....	12
2.3 Inseminação com sêmen fresco.....	14
3 CONCLUSÃO	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

1. INTRODUÇÃO

No Antigo Testamento o ovino é o primeiro animal doméstico a ser citado (Genises 4:2), onde Abel, filho de Adão e Eva era pastor de ovelhas.

As evidências da relação entre o ser humano e a espécie ovina, *Ovis aries* datam do período anterior à história escrita. Iniciada pelos hebreus na planície mesopotâmica e Ásia central, sua longa trajetória demonstra sua importância, através da utilização de sua incrível capacidade de conversão forrageira em produtos como carne, lã, pele, leite e derivados (SÁ & SÁ,2009).

No Brasil a introdução da criação deu-se principalmente pela colonização espanhola, inicialmente voltada a produção de lã no sul do país. A evolução da indústria têxtil e o desenvolvimento de fibras sintéticas ocasionaram queda nos preços internacionais do produto, levando a alteração no perfil produtivo e tornando a produção de carne a principal atividade nos rebanhos do país. (MARTINS et al, 2006)

Atualmente com cerca de 13,8 milhões de cabeças (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006), a carne ovina brasileira vem mudando de um padrão de comercialização rural e grande informalidade, para atender a um mercado urbano, com maior exigência de qualidade. Para atender ao novo padrão de consumo, os produtores sentem a necessidade de melhorar e intensificar seus índices produtivos, entre esses aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho.

Em condições naturais os animais expressam seu potencial reprodutivo subaproveitado, e a capacidade de deixar descendentes restrita, por fatores fisiológicos. A utilização de biotecnologias da reprodução animal, como inseminação artificial (IA), transferência de

embrião (TE), fertilização *in vitro* (FIV), clonagem, entre outras, vêm se mostrando como eficientes ferramentas para otimizar o potencial reprodutivo, além da seleção e disseminação de animais com genética comprovadamente superior.

A espécie ovina tem como características um curto intervalo entre gerações, devido ao reduzido tempo de gestação, aproximadamente cinco meses, e atinge a puberdade a partir dos seis meses de idade (AISEN, 2008) sendo as borregas incorporadas rapidamente ao plantel de matrizes, gerando a necessidade de controles rigorosos de escrituração zootécnica, e incorporação de novos reprodutores no rebanho, gerando renovação genética, impedindo a possibilidade de ocorrência de consangüinidade,

A utilização da IA não visa aumentar as taxas de fertilidade de cada fêmea, mas sim incrementar a capacidade de popularização de um macho, sendo que um carneiro em regime de monta natural cobrirá entre 30 e 50 fêmeas durante uma estação de monta. Se utilizado no mesmo período em um sistema de monta dirigida, apenas impedido que o macho cubra repedidas vezes a mesma fêmea, minimizando desgaste físico e desperdício de ejaculados, esse número já sobe para 100 a 200 fêmeas. Nos programas de IA, há um aumento significativo do aproveitamento de cada ejaculado, o que permite que o mesmo sirva diversas fêmeas. (AISEN, 2008).

Como técnica menos onerosa, por não requerer equipamentos sofisticados, e mão de obra altamente qualificada, a IA utilizando sêmen fresco, é uma possibilidade a ser adotada em rebanhos para produção de carne ovina, sem comprometimento nas margens de lucro. Diminuindo a relação macho/fêmea, além dos custos de manutenção, e riscos de mortalidade, o produtor tem possibilidade de agregar genética ao

rebanho, adquirido machos superiores, que possuem alto custo no mercado, fato que seria inviável em caso de monta natural. Além de possibilitar um melhor controle nas coberturas, direcionando os machos a serem escolhidos para cada grupo de fêmeas.

2. Revisão de Literatura

2.1 Coleta e avaliação do sêmen ovino

O sêmen é uma suspensão líquida, resultante do processo de ejaculação, é constituído por uma fração fluida produzida pelas glândulas anexas, que é denominada plasma seminal, e uma fração celular, constituída dos gametas masculinos, os espermatozóides, produzidos nos túbulos seminíferos a partir de células germinativas, as espermatogonias (GARNER & HAFEZ, 2004).

Atualmente, existem diversos métodos para obtenção do sêmen ovino, coleta por vagina artificial, eletro ejaculação, coletores vaginais, canulação do ducto deferente e coleta *post-mortem* da cauda do epidídimo, (AISEN, 2008) sendo o primeiro método o mais utilizado, pois produz amostras o mais próximo possível dos padrões fisiológicos da espécie (CBRA, 1998).

A vagina artificial simula o genital feminino no momento da cópula, que através de estímulo mecânico e térmico estimulam o macho a ejacular. Constituída de um cilindro externo (corpo), mucosa, válvula e tubo coletor, ela deve estar entre 40 e 42°C no momento da coleta. Uma fêmea deve ser contida para ser utilizada como manequim, o operador da vagina artificial deve aguardar o momento do salto, e com a mão no prepúcio, desviar o pênis para interior da mesma (AISEN & VENTURINO, 2008). O rendimento do ejaculado pode ser aumentado pela maior

estimulação das glândulas anexas, para isso deve-se realizar um salto interrompido, anterior ao momento da coleta (RODRIGUES et al., 2009). O tubo coletor deve estar previamente aquecido, para evitar choque térmico, e protegido de luz.

Segundo o manual de andrologia do CBRA (1998), para avaliação do ejaculado devem ser realizados testes imediatos a coleta, de caráter macroscópico, são eles: volume, aspecto, cor, odor e movimento de massa; e os microscópicos: turbilhonamento vigor e motilidade individual, além dos testes mediatos: concentração e morfologia espermática.

Estas avaliações *in vitro* da qualidade do sêmen, podem ser utilizadas para predizer a capacidade fertilizante do reprodutor, bem como a possibilidade da utilização do mesmo para monta natural e/ou programas de IA (LÓPEZ et al., 1999)

Para determinar um carneiro como apto a reprodução, os padrões mínimos exigidos para sêmen fresco pelo manual de andrologia do CBRA (1998) e segundo Aisen (2008), são: motilidade progressiva, realizada após a clarificação, em um aumento de 40 vezes, analisando o percentual de móveis em relação ao total de células, que deve ser superior a 70%; vigor, que pode ser avaliado no mesmo momento da motilidade, classificando o tipo de movimento, em uma escala de 0 a 5, não devendo possuir valor inferior a 3; e percentual de espermatozóides morfologicamente anormais inferior a 20%, em contagem feita ou em esfregaços corados, ou através de preparação úmida em microscopia de contraste de fase, contando entre 100 e 200 células. A concentração deve ser feita na diluição de 1:400 e contagem na câmara de Neubauer, ou por espectrofotometria, possuindo valores superiores a $2,5 \times 10^9$ espermatozóides/mL.

Contudo, tais critérios de avaliação podem variar conforme o examinador, por possuírem certo grau de subjetividade, e assim resultar numa variação de resultados. Novos sistemas de avaliação computadorizada vem sendo desenvolvidos para auxiliar, e aumentar a sensibilidade dos resultados (YOSHIDA, 2000).

2.2 Inseminação artificial em ovinos

Em 1776, Lázaro Spallanzani documentou o primeiro registro de IA, quando o fisiologista italiano obteve o nascimento de cães utilizando esta técnica em cadelas (AX et al.; AISEN, 2008). Na espécie ovina os primeiros trabalhos foram realizados pelo russo Ivanov, que é considerado o verdadeiro precursor desta técnica, após a primeira guerra mundial, Milovanove, em 1930, relatou a utilização de sêmen fresco *in natura* e diluído, em programas de acasalamentos em ovinos (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A técnica de IA consiste na coleta do sêmen de um reprodutor, e introdução desse no aparelho reprodutor da fêmea, não existindo contato direto, copula, entre o macho e a fêmea (AISEN, 2008)

Realizada com critério, e de maneira adequada a IA confere diversas vantagens como ferramenta reprodutiva. O melhoramento genético do rebanho, através de seleção e maior difusão de machos superiores, programas de testes de progênie, identificando precocemente animais melhoradores, permite a conservação e facilidade de transporte do material genético através de métodos de criopreservação, redução do número de machos da propriedade, e a prevenção e controle de enfermidades transmitidas no momento da cobertura (AX et al., 2004.; ANEL et al., 2006; AISEN, 2008).

Além do macho, o êxito do programa de inseminação artificial está diretamente relacionado ao manejo das fêmeas. AISEN (2008) recomenda que antes do início da estação de monta as matrizes devem passar por um processo de seleção e avaliação das condições de escore corporal, evitando as fêmeas excessivamente gordas, ou em estado de subnutrição; deve-se ainda avaliar cascos e aprumos, e condição

sanitária. Em fêmeas lanadas pode ser promovida tosquia higiênica na região perivulvar. A identificação individual deve ser realizada e/ou confirmada para facilitar anotações, e registros dos parâmetros reprodutivos.

Ao contrário de outras espécies domésticas, como bovinos, bubalinos e eqüinos, a impossibilidade do toque retal, e a anatomia cervical da ovelha dificulta a inseminação pela via transcervical (ANEL et al., 2006). Formado por um estreito lúmen e anéis tortuosos, a cérvix é um grande empecilho na IA com sêmen criopreservado além de alguns tipos de ostio cervical externo dificultarem a identificação de seu orifício (HALBERT et al., 1990; AISEN, 2008).

As técnicas de inseminação artificial são classificadas principalmente de acordo com o local da deposição do sêmen (FONSECA & SIMPLICIO, 2008), que podem ser vaginal, cervical superficial, cervical profunda, intra uterina trans-cervical e intra uterina por via laparoscópica. (AISEN, 2008). A técnica laparoscópica é considerada de eleição na utilização de sêmen congelado (SALAMON & MAXWELL, 2000), mas o alto grau de complexidade, e custo elevado, limita sua utilização em rebanhos para produção de carne (ANEL et al., 2006).

A inseminação vaginal e cervical superficial são as técnicas mais utilizadas na espécie ovina, obtendo ótimos resultados de fertilidade quando utilizadas com sêmen fresco e resfriado. Kerton et al. (1984) citado por Anel (2006), ao compará-las obtiveram fertilidade de 31% e 53%, respectivamente; provando a notável superioridade da inseminação cervical.

O momento da inseminação é outro fator a ser considerado na obtenção de melhores índices, permitindo que os espermatozóides estejam aptos a fecundar, no momento da ovulação. O cio da ovelha dura entre 24 e 36 horas, e termina com a ovulação. Com o avançar do estro o muco vaginal da fêmea muda passando do aspecto cristalino para o estriado e no final caseoso, podendo ser utilizado para avaliar o tempo que a fêmea esta em cio. O sêmen fresco necessita de um tempo maior para capacitação e possui maior longevidade no trato genital feminino. (JAINUDEEN et al., 2004). Aisen (2008) demonstrou a fertilidade da inseminação a fresco na presença de muco cristalino de 80%, estriado 60% e caseoso 25%.

2.3 Inseminação com sêmen fresco

Esta modalidade de inseminação vem sendo há muito tempo utilizada no Rio Grande do Sul, apresentando resultados favoráveis (NEVES et al., 1982) utilizando preferencialmente a técnica de IA cervical, simples, não necessita de acondicionamento, e com aplicabilidade em manejo nos currais (AISEN, 2008).

A utilização de machos com desvio lateral de pênis e prepúcio, vazectomizados, e machos castrados ou fêmeas androgenizadas é essencial para detecção do estro, diferente de outras espécies com comportamento sexual mais marcante, como caprinos e bovinos,

favorecendo que a inseminação ocorra no momento correto. O número de observações também é importante para que não se perca nenhum cio, diminuindo assim o número de inseminações. A marcação com tinta no peito dos rufiões facilita a identificação pelos observadores (FREITAS & RUBIANES, 2008). A utilização de cio natural, quando comparado aos induzidos por fármacos, permite melhores índices de fertilidade, além de se encaixar melhor no custo das propriedades. Paulenz et al. (2005), obtiveram 75% de prenhes utilizando esse modelo.

O procedimento de IA cervical consiste em, primeiramente, realizar a higienização da fêmea que deve ser colocada com o posterior sobre uma barra, ficando em posição oblíqua; o inseminador, com um espéculo vaginal ou vaginoscópio e auxílio de uma fonte luminosa localiza o ostio cervical externo, verifica então o muco vaginal, o classifica, e promove sua limpeza. Utilizando uma pipeta ou seringa para aplicação, a introduz no orifício, afasta o especulo pra reduzir o refluxo e deposita lentamente o sêmen, desce a fêmea e realiza massagem no clitóris, por fim, registra os dados (AISEN, 2008).

Em média, o ejaculado de um carneiro pode ser utilizado in natura para inseminar em torno de 10 a 20 ovelhas (NEVES et al., 1982), com taxa de fertilidade entre 70 e 80%, porém, ao utilizar diluentes a base de leite, ovo, alguns autores obtiveram índices de prenhes semelhante, com maior número de inseminações por ejaculado (MARTIN & WATSON, 1976; LANGFORD & MARCUS, 1982; SALAMON & MAXWELL, 2000).

A concentração espermática das diluições deve ser avaliada também, sendo o ideal uma concentração em torno de 100 a 200 x 10⁶ espermatozoides/ml, para que se mantenham as taxas de gestação (LANGFORD & MARCUS, 1982).

Para evitar o refluxo e possibilitar sucesso na inseminação, o volume é outro fator importante, quando comparados volumes de 0,25 mL, 0,1 e 0,05, o primeiro apresentou taxa de refluxo de 60% do volume total, e os dois últimos em torno de 40% (AISEN, 2008).

Além dos fatores citados como, técnica de inseminação, dose inseminante, volume e profundidade da inseminação, (ANEL et al., 2006) alguns itens relacionados à propriedade interferem drasticamente no sucesso do programa de IA. As práticas de manejo, bem como as boas práticas na sua realização, relacionadas principalmente com o bem estar animal podem influenciar nas taxas de prenhes (AISEN, 2008).

3. Considerações Finais

A inseminação artificial utilizando sêmen fresco é uma saída economicamente viável para rebanhos de ovinos criados para abate, possibilitando uma melhor utilização dos machos da propriedade.

Para sucesso no programa de IA, alguns critérios devem ser obedecidos, desde a seleção de machos comprovadamente melhoradores, e com sua capacidade fertilizante testada por prévio exame andrológico. A técnica da IA deve ser rigorosamente seguida, obedecendo à concentração espermática ideal, volume e local da deposição.

Um modulo mínimo de produção deve ser respeitado para a implementação da técnica na propriedade, justificando a intensificação do manejo do rebanho, assim demonstrado seu grande potencial como ferramenta de reprodução assistida, levando a obtenção de índices superiores, com maior retorno econômico ao produtor.

Referências Bibliográficas

AISEN, E. G. Inseminação artificial de ovelhas e cabras. In: AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina**. Tradução Sony Dimas Bicudo. São Paulo: MedVet, 2008. p. 101-114.

AISEN, E. G.; VENTURINO, A. Coleta e avaliação do sêmen. In: AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina**. Tradução Sony Dimas Bicudo. São Paulo: MedVet, 2008. p. 57-74.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR; F., GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 41, suppl.2, p. 30-42. 2006

AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. p. 381-394.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **O Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ªed. Belo Horizonte, 1998. p. 49

FONSECA, J. F.; SIMPLICIO, A. A. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1., 2008, Belém. **Anais...** Belém: Instituto Frutal, 2008. 21f.

FREITAS, V. J. F.; RUBIANES, E. Preparação das fêmeas. Detecção do estro e da ovulação. In: AISEN, E. G.; BICUDO, S. D. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet, 2008. p. 101-114

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e plasma seminal. In:HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97-110

HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S.; BUCKRELL, B. C. The structure of the cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v. 33, p. 977–992, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006, resultados preliminares**: Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>> Acesso em: 12 ago. 2009. JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Ciclos reprodutivos – ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. p. 173-182.

LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J. Influence of sperm number and seminal plasma on fertility of progestagen-treated sheep in confinement. **J. Reprod. Fertil.**, v. 65, p. 325-329, 1982.

LÓPEZ, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta Vet. Scand.**, v. 40, p.1-9, 1999.

MARTINS, E. C.; GARAGORRY, F.L. ; CHAIB, H. F. Evolução da ovinocultura brasileira no período de 1975 a 2003. **Com. Tec. Cent. Nac. Pesqui. Caprinos**, n.67, p.1-4, 2006.

NEVES, J. P.; IRALA, P. N. D.; GONZALEZ, C. I. M.; DORNELLES, W. J. M. Utilização do diluente Tris na inseminação artificial em ovinos. **Rev. Cent. Cienc. Rurais**, v. 12, p. 181-187, 1982.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; ADNOY, T.; NORDSTOGA, A. B.; ANDERSEN, M.; BERG, K. Effect of vaginal and cervical deposition of

semen on the fertility of sheep inseminated with frozenthawed semen. **Vet. Rec.**,v. 156, p. 372–375, 2005.

RODRIGUES A.L.R.; TUTIDA L.; BICUDO, S.D. O maior tempo de latência à coleta de sêmen de carneiros aumenta o volume ejaculado e a concentração espermática total. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. p.157-158

SÁ, O. C.; SÁ, J. L. **História dos ovinos**. Disponível em: <<http://www.crisa.vet.br/historia.htm> > Acesso em: 31 jul. 2009.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62. p. 77-111, 2000.

WATSON, P. F.; MARTIN, I. C. Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. **Theriogenology**. v6:559-64.1976

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 349-55, 2000.