

## INSEMINAÇÃO LAPAROSCÓPICA EM OVELHAS COM CIO NATURAL INDUZIDO E SINCRONIZADO ANTES E DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA

### LAPAROSCOPIC INSEMINATION IN EWES WITH NATURAL, INDUCED AND SYNCRONIZED ESTROUS BEFORE AND DURING THE REPRODUCTIVE SEASON

Jairo Pereira Neves<sup>1</sup>

Sergio Luís Nadal da Luz<sup>2</sup>

#### RESUMO

Trezentas e vinte e nove ovelhas Corriedale com idade entre 2 e 6 anos foram submetidas a inseminação laparoscópica com sêmen congelado em pellet para verificação dos efeitos do cio natural, induzido e sincronizado com esponjas (MAP- 50mg, por 12 dias), fora e dentro da estação reprodutiva utilizando ou não eCG (Equine Chorionic Gonadotrophin), no percentual de prenhez. A aplicação do sêmen foi entre 58 e 66 horas após retirada das esponjas, com pelo menos 40% de motilidade progressiva pós-descongelamento e cada ovelha recebeu um mínimo de 50 milhões de espermatozoides totais por dose. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 40 dias por ecografia. Ficou evidenciado que os percentuais de prenhez obtidos foram satisfatórios somente quando foi utilizado o eCG tanto fora (64,91%) quanto dentro (62,11%) da estação reprodutiva. A utilização única do MAP sem eCG apresentou resultados razoáveis (40,91%) na estação reprodutiva. A utilização de cio natural propiciou a obtenção de 63,51% de prenhez. Com base nos resultados obtidos conclui-se que a inseminação intrauterina por laparoscopia em ovelhas

com cio induzido ou sincronizado dentro e fora da estação reprodutiva, desde que com a utilização de eCG, assim como em estro natural, apresenta resultados satisfatórios.

**Palavras-chave:** inseminação, laparoscopia, sincronização estral, ovelhas.

#### SUMMARY:

Three hundred and twenty-nine Corriedale ewes, between two and six years old, were inseminated by laparoscopic method with frozen semen in pellet to verify the fertility with natural, induced and synchronized estrous. Sponge with 50mg of MAP was used intravaginal during 12 days, out and within the reproductive season either with or without eCG (Equine Chorionic Gonadotrophin) at the moment of removing the sponges to induce or to synchronize estrous in the ewes. The insemination was between 58 and 66 hours after withdrawal of the sponges, with at least 40% of progressive motility after thawing and each ewe received at least 50 millions total sperm per dose. The pregnancy diagnosis was performed at 40 days by

<sup>1</sup> Médico Veterinário, Doutor, Professor Titular, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria. 97119-900 - Santa Maria, RS.

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Mestre, Autônomo. 97560-000 - Quaraí, RS.

ultrasound. It was observed that satisfactory percentage of pregnancy was obtained only when eCG was injected in both out (64.91%) and within (62.11%) of the reproductive season. During the reproductive season, the results were just fair when MAP was used without eCG. With natural estrous, the percentage of pregnancy was 63.51%. In conclusion, the results showed that the intrauterine insemination with frozen semen in ewes with natural, induced and synchronized estrous using laparoscopy are satisfactory, in both within and out of the reproductive season when eCG is used.

**Key words:** insemination, laparoscopy, estrous synchronization, ewes.

## INTRODUÇÃO

A rápida multiplicação de indivíduos portadores de características zootécnicas e geneticamente desejáveis constitui-se num dos fatores de maior relevância para aumento da produtividade de um rebanho (NEVES, 1990). A inseminação artificial (IA) laparoscópica, com sêmen congelado possibilita a concretização deste objetivo sendo, habitualmente, realizada em ovelhas submetidas a sincronização deaios e ovulação estimulada, visto que o número de animais a ser inseminado é geralmente reduzido (BONIFACINO et al., 1987; EVANS, 1988).

O uso de esponjas impregnadas com progesterógenos em ovelhas que estejam ciclando permite o controle do estro e da ovulação (ROBINSON, 1965). No período anestrado este tratamento tem sido insuficiente para proporcionar resultados satisfatórios (ROBINSON, 1971; MIES FILHO, 1974; COLAS, 1975; LUZ et al., 1989).

Através da IA intrauterina por laparoscopia com cio natural, e sêmen congelado, é possível obter-se percentuais de prenhez similares aos obtidos com sêmen fresco via cervical, segundo PERDIGON et al. (1987).

Procedeu-se a verificação dos efeitos da inseminação artificial laparoscópica antes e durante a estação reprodutiva, com e sem a utilização de eCG assim como em cio natural, na prenhez de ovelhas Corriedale criadas extensivamente na região da campanha do Estado do Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 329 ovelhas da raça Corriedale com idade entre 2 e 6 anos, previamente submetidas a exame ginecológico (SILVA & NEVES, 1983), criadas extensivamente na região da Campanha, no Estado do Rio Grande do Sul.

Para indução ou sincronização dosaios as ovelhas receberam esponjas intravaginais impregnadas com 50mg de MAP<sup>a</sup> (acetato de medroxiprogesterona) por 12 dias, com ou sem a utilização de eCG<sup>b</sup> (Equine Chorionic Gonadotrophin), pela via intramuscular. As inseminações realizadas nos meses de novembro, dezembro e janeiro foram consideradas como fora da estação reprodutiva enquanto que as realizadas no mês de março como dentro da estação conforme abaixo especificado:

A - 59 ovelhas foram inseminadas fora da estação após indução de cio por pessários vaginais (50mg de MAP) por 12 dias, sem eCG;

B - 57 ovelhas foram inseminadas fora da estação após indução de cio através de pessários vaginais (grupo A) mais 600UI de eCG, via intramuscular, por ocasião da retirada das esponjas;

C - 44 ovelhas foram inseminadas nas mesmas condições das do grupo A, porém no mês de março;

D - 95 ovelhas foram inseminadas em condições semelhantes às do grupo B, no mês de março, recebendo, no entanto, 400UI de eCG.

Para a verificação da eficiência da aplicação do sêmen em cio natural, 74 ovelhas foram inseminadas durante o mês de março, logo após o aparte da manhã, sem jejum prévio e comparadas com 95 submetidas a sincronização (Tabela 1, grupo D).

A inseminação laparoscópica (IAL) fundamentou-se na técnica de KILLEN & CAFFERY (1982), em ovelhas previamente submetidas a um jejum completo de 12 horas para facilitar o acesso ao útero. A contenção foi, em mesas metálicas, especiais para este fim, nas quais as ovelhas ficavam em decúbito dorso-obliquo, num ângulo de 60 graus, com a porção caudal suspensa, provocando o deslocamento das vísceras no sentido cranial. Posteriormente procedeu-se à tosquia, anti-sepsia e anestesia local com 6ml de cloridrato de lidocaina a 2%<sup>c</sup> na região das punções.

Foi utilizado um laparoscópio STORZ<sup>d</sup>. As ovelhas a serem inseminadas foram submetidas a punção por dois trocarteres, 3 a 4cm lateralmente à linha média, um de cada lado, 5 a 7cm cranialmente ao úbere, com as punções sendo realizadas em direção à cabeça do fêmur, de cada lado, para se evitar a perfuração da bexiga e do rúmen. Evitou-se também provocar lesões nas veias mamárias que localizam-se próximas à região das punções. O trocarter de esquerda foi utilizado para a insuflação de gás carbônico e penetração do telescópio. No trocarter direito, inicialmente, aplicou-se um manipulador para posicionamento do útero e, posteriormente, uma pipeta com o sêmen com o qual procedeu-se à punção, na curvatura maior e porção medial, de cada corno uterino. Para a IAL utilizou-se uma pipeta de vidro com diâmetro ex-

terno de 5mm e interno de 3mm. Uma das extremidades foi afilada na chama do bico de Bunsen, e a outra adaptada a uma seringa de 1ml, através de uma conexão de borracha. As inseminações pós indução ou sincronização realizaram-se entre 58 e 66 horas depois da retirada das esponjas vaginais enquanto que nas de estro natural logo após o aparte ainda no período matinal. Logo após a inseminação artificial as ovelhas receberam um repelente (e) no local das punções.

Foram utilizados rufiões da raça Corriedale, previamente submetidos a exame dos ejaculados, colhidos por eletroejaculação, os quais receberam diariamente tinta amarela (pó Xadrez com óleo queimado), na região esternal, antes de serem colocados com as fêmeas. As ovelhas com estro sincronizado receberam 10% de rufiões logo após a retirada das esponjas, os quais foram mantidos até o momento da inseminação, com exceção do grupo D. Para a detecção do cio natural utilizou-se um rufião para cada 20 ovelhas com as quais ficavam a partir das 18 horas de um dia até as 7 horas do dia seguinte, em potreiro pequeno e com alimentação reduzida.

Utilizou-se sêmen de um carneiro Corriedale, congelado segundo a técnica de EVANS (1987) utilizando um diluente composto por 3,87g de Tris (Hydroximetil)aminometano; 0,533g de glicose; 2,123g de ácido cítrico; 16ml de gema de ovo; 5,3ml de glicerol; 100.000UI de penicilina; 100mg de estreptomicina; e água tri-destilada e deionizada até 100ml. Cada pellet tinha um volume aproximado de 0,16ml, com pelo menos 100 milhões de espermatozoides sendo utilizado para duas ovelhas. Para o descongelamento foram colocados dois pellets por vez, em um tubo de ensaio, em banho-maria à 38°C, tendo-se o cuidado de agitar o tubo até o total descongelamento. A manutenção do sêmen descongelado, até a IAL, foi em outro banho-maria à 30°C. Utilizaram-se amostras com um mínimo de 40% de movimento progressivo, conforme EVANS & MAXWELL (1987).

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia 40 dias após a inseminação conforme ALVES (1992).

Os efeitos da estação reprodutiva e eCG assim como da sincronização de cios foram analisados por um teste para dados categóricos. Este procedimento não paramétrico foi realizado usando o PROC. CATMOD no programa estatístico (SAS INSTITUTE INC). Uma tabela de contingência em duas dimensões foi formada pelos diferentes grupos do experimento e o número de animais gestantes nos diferentes tratamentos. Quando mais de dois grupos foram analisados a comparação foi realizada por contraste no teste CATMOD.

## RESULTADOS

A verificação dos efeitos dos métodos de indução ou sincronização fora e dentro da estação reprodutiva estão expressos na Tabela 1. Pelo que se pode observar ficou evidenciado que os percentuais de fecundação obtidos foram satisfatórios somente quando foi utilizado o eCG. A não utilização desta gonadotrofina apresentou um percentual apenas razoável na estação reprodutiva (40,91%), e totalmente inviável fora da mesma.

Tabela 1. Prenhez de ovelhas Corriedale, inseminadas intrauterinamente por laparoscopia, com sêmen congelado, após indução ou sincronização de cio dentro e fora da estação reprodutiva, utilizando MAP (acetato de meddroxiprogesterona) com e sem eCG (Equine Chorionic Gonadotrophin).

Grupo	Estação Reprodutiva	eCG UI	Total n	Gestantes	
				n	%
A	Fora	-	59	01	1,69a
B	Fora	600	57	37	64,91 b
C	Dentro	-	44	18	40,91 c
D	Dentro	400	95	59	62,11 b
TOTAL			255	115	45,09

a x b ( $\chi^2 = 19,58$ ;  $P < 0,00001$ )  
a x c ( $\chi^2 = 12,27$ ;  $P < 0,0005$ )  
c x b ( $\chi^2 = 5,35$ ;  $P < 0,002$ )

A utilização do cio sincronizado, em relação ao natural para IA de ovelhas por laparoscopia (Tabela 2) evidenciou que a sincronização não provocou redução significativa na percentagem de prenhez.

Tabela 2. Prenhez de ovelhas Corriedale, inseminadas intrauterinamente, por laparoscopia, com sêmen congelado, em cio sincronizado (com eCG - Equine Chorionic Gonadotrophin) e natural, na estação reprodutiva.

Estro	Total n	Gestante	
		n	%
Sincronizado	95	59	62,11
Natural	74	47	63,51
Total	169	106	62,72

$\chi^2 = 0,035$  ( $P > 0, 851$ )

## DISCUSSÃO

Os percentuais de prenhez obtidos no grupo A (Tabela 1) foram nitidamente insatisfatórios confirmando experimentos anteriormente realizados (ANDERSEN et al., 1973; MIES FILHO, 1974; COLAS, 1975). Com relação aos percentuais obtidos no grupo B ficou evidenciada a necessidade de utilização do eCG, corroborando com o anteriormente descrito por EVANS & MAXWELL (1987), pelo fato de que o eCG é um hormônio com atividade biológica de FSH e LH na mesma molécula (ALLEN & STEWART, 1978). O baixo resultado obtido no grupo A em relação ao C é explicado pela inibição provocada pelo estradiol na secreção tônica de gonadotrofina, a qual ocorre no anestro e na pré-estação reprodutiva (KARSCH, 1984). O resultado obtido no grupo C foi inferior ao do B e D devido, provavelmente à não utilização de eCG confirmando em parte como relatado por ROBINSON (1965). A utilização única de progestágenos produz problemas no transporte e sobrevivência espermática (QUINLIVAN & ROBINSON, 1969). Neste sentido, ALLISON (1982) e SMITH et al. (1975) obtiveram resultado semelhante. CROSBY & HURRAY (1988) observaram um aumento dos índices de prenhez através da utilização do efeito macho; isto pode ter favorecido os resultados obtidos nos grupos B e D em relação ao C. Não se verificou diferença entre os percentuais de prenhez entre os grupos cio sincronizado e natural (Tabela 2). Estes resultados, semelhantes aos de PERDIGON et al. (1987), foram superiores aos de AZZARINI & VALLEDOR (1987), considerando a utilização de cio natural, em determinadas circunstâncias pode ser uma alternativa sob o ponto de vista econômico pela eliminação dos custos com a sincronização estral.

## CONCLUSÃO

A inseminação intrauterina por laparoscopia em ovelhas com cio induzido e sincronizado, fora e dentro da estação reprodutiva, desde que com utilização de eCG, apresenta resultados satisfatórios e semelhantes aos obtidos com estro natural.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - PROMONE E - Tuco Div. de Upjohn Prod. Farm. Ltda.: Caixa Postal 1100 - São Paulo - SP.
- b - SYNTEX: Equine Chorionic Gonadotrophin - Indústria Argentina.
- c - XYLOCAÍNA 2%: Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda. Av. Mário Leão, 1500, Santo Amaro - São Paulo.
- d - H. STRATTNER & CIA LTDA.: Rua Ricardo Machado, 904, São Cristovão - Rio de Janeiro - RJ.
- e - BIBESOL: Rhodia Merleux Veterinária Ltda. Fazenda São Francisco, Paulínea - SP.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.C. **Biópsia vaginal, dosagem de progesterona, laparoscopia e ultra-sonografia, como meios de diagnóstico de gestação em ovinos.** Santa Maria - RS. 1992. 61 p. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1992.
- ALLEN, W.R., STEWART, F. The biology of pregnant mare serum gonadotrophin. In: MARTINS NIJHOLF. **Control of reproduction of the cow.** Cambridge: J.R. Sreenem, 1978. p. 50-72.
- ALLISON, A.J. Techniques of modifying reproductive performance. In: WICKHAM, G.A., McDONALD, M.F. **Breeding and reproduction.** Auckland: Ray Richard Publisher, 1982. Cap. 10. p. 239-263.
- ANDERSEN, K., AAMDAL, J., FOUGNER, J.A. Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. **Zuchthyg**, v. 8, p. 113-118, 1973.
- AZZARINI, M., VALLEDOR, F. Inseminación intrauterina com semen congelado en ovejás. **Ovinos y Lanás**, Montevideo, v. 16, p. 7-14, 1987.
- BONIFACINO, L.A., PERDIGON, F., NEVES, J.P., et al. Inseminação artificial por laparoscopia em ovinos com utilização de sêmen congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1987. Belo Horizonte, MG. **Resumos...** Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. 106 p. p. 102.
- COLAS, G. The use of progestagen SC 9880 as an aid for artificial insemination in ewes. **Ann Biol Anim Biochem Biophys**, v. 15, p. 317-327, 1975.
- CROSBY, T.F., MURRAY, B.F. A comparison of PMSG and teaser rams on reproductive performance in ewe lambs. IN : CONGRES MONDIAL DE REPRODUCTION ET SELECTION DES OVINS ET BOVINS A VIANDE, 1988. Paris. **Proceedings...** Sydney, p. 429-430.
- 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.** Sidney: Butterworths, 1987. 194 p.
- KARSCH, F.J. Endocrine and environmental control of oestrus cyclicity in sheep. In: **Reproduction in sheep.** Canberra, Australian wool corporation, 1984. p. 10-15 (Technical publication).
- KILLEN, I. D., CAFFERY, G.F. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Aust Vet J**, Austrália, v. 59, p. 95, 1982.
- LUZ, S.L.N., NEVES, J.P., OLIVEIRA, J.F.C. Influência de várias preparações de PMSG na fecundidade de ovelhas Corriedale inseminadas, via intrauterina, por laparoscopia, fora da estação reprodutiva. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 13, n. 1, p. 15-20, 1989.
- MIES FILHO, A. Regulação do ciclo estral em ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1974. São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, 1974. p. 268-273.

- NEVES, J.P. **Caprinocultura e Ovinocultura. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990.** Novas técnicas de inseminação artificial de ovinos: p. 57-67.
- PERDIGON, F. SIENRA, I, CARBO, A. Insemination intrauterina por laparoscopia com semen congelado en celo natural en ovinos. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIA, 1987. Montevideo. **Resumos...** Montevideo, 1987.
- QUINLIVAN, T.D., ROBINSON, T.J. Numbers of spermatozoa in the genital tract after artificial insemination of progestagen-treated ewes. **J Reprod Fert**, v. 19, p. 73-86, 1969.
- ROBINSON, T.J. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrus cycle in the sheep. **Nature**, v. 206, p. 39-41, 1965.
- ROBINSON, T.J. The seasonal nature of reproductive phenomena in the sheep. II. Variation in fertility following synchronization of oestrus. **J Reprod Fert**, v. 24, p. 19-27, 1971.
- SILVA, C.A.M., NEVES, J.P. Eficiência reprodutiva após tratamento de infecções genitais num rebanho ovino do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras Reprod Animal**, v. 7, n. 3, p. 25-28, 1983.
- SMITH, J.F., BOYS, P.T.S., DROST, H., et al. A.I. of sheep with frozen semen. **Animal production**, v. 35, p. 71-77, 1975.