

Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica

Parameters to evaluate ovine frozen semen for laparoscopic insemination

Sérgio Luís Nadal da LUZ¹; Jairo Pereira NEVES²; Paulo Bayard Dias GONÇALVES²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Jairo Pereira Neves
Departamento de Clínica de Grandes Animais
Hospital de Clínicas Veterinárias
Universidade Federal de Santa Maria
97105-900 – Santa Maria – RS
e-mail: jpneves@lince.hcv.ufsm.br

1-Faculdade de Veterinária da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba – PR
2-Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria – RS

RESUMO

Com a finalidade de verificar o valor de alguns atributos para avaliação da qualidade do sêmen congelado, através da prenhez, duzentas e noventa e sete ovelhas da raça Corriedale foram inseminadas, intra-uterinamente, por laparoscopia. Utilizou-se cio sincronizado, com pessários vaginais contendo 50 mg de MAP (acetato de medroxiprogesterona), por 12 dias, e 400 UI de eCG (Equine chorionic gonadotrophin) no 12º dia. O sêmen, proveniente de 32 carneiros, foi congelado em *pellets*. Para a inseminação, utilizaram-se amostras de sêmen com diferentes padrões de qualidade preestabelecida, de motilidade progressiva (MP) ao descongelamento, média da MP durante todo o período de incubação (0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas), a 37°C, MP após cinco horas de incubação e percentagem de células, morfologicamente, íntegras. O diagnóstico de gestação foi realizado por ecografia 40 dias após a inseminação. Obtiveram-se percentuais de prenhez entre 60 e 80% somente quando as amostras apresentaram um movimento progressivo superior a 40% (68,0%), uma MP média e após 5 horas de incubação mínima de 20% (64,4 e 72,3%) e uma MP às 5 horas de incubação quando superior a 10% (61,1 e 78,5%). Com relação ao percentual de células íntegras, as amostras com um mínimo de 40% proporcionaram prenhez de 61,7 e 66,4%, enquanto nas com menos de 40% o percentual foi de apenas 15,2%. Os parâmetros estudados demonstraram eficiência para estimar a capacidade fecundante do sêmen congelado para utilização em inseminação laparoscópica.

UNITERMOS: Sêmen congelado; Inseminação intra-uterina; Laparoscopia; Ovino.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) em ovinos, que a curto prazo representa uma enorme possibilidade de incrementar o melhoramento genético, era restrita à utilização de sêmen fresco. Essa biotecnologia da reprodução obteve um grande impulso, após o desenvolvimento da técnica de aplicação intra-uterina de sêmen por laparoscopia¹², permitindo a utilização exitosa do sêmen congelado. No Brasil, a inseminação artificial por laparoscopia foi relatada pela primeira vez por Bonifacino-Artola *et al.*⁴ A criopreservação do sêmen em *pellets*, nessa espécie, tem sido utilizada rotineiramente na Austrália, Estados Unidos e também no Brasil. Um dos fatores indispensáveis para o sucesso dessa técnica é a utilização de sêmen de qualidade comprovada.

Os testes laboratoriais para avaliação do sêmen são importantes não só para uma predição da fertilidade, mas também para o estudo de novos meios de sua preservação. A motilidade, o vigor⁵ e os testes de termorresistência preconizados para bovinos^{6,11} e ovinos^{4,8} são os mais utilizados

pelos profissionais que realizam a preservação de sêmen. Em bovinos³, verificou-se uma correlação positiva para motilidade progressiva após teste de termorresistência rápido (1 hora a 45°C) e lesão de acrossomo após a descongelação. No entanto, a motilidade e a morfologia espermática, quando utilizados para predição da fertilidade, nem sempre são parâmetros eficientes para ovinos¹⁴. Na avaliação do sêmen bovino, os testes de termorresistência lento (5 horas de incubação a 38°C), rápido (30 minutos a 46°C) e estressado (24 horas a 5°C) demonstraram uma correlação entre o número de espermatozoides ativos após o teste e a taxa de fecundação, permitindo com isso a eliminação prévia de amostras de sêmen inadequadas, ou seja, as que apresentam motilidade final inferior a 20% no final da incubação^{6,11}. Existe também outro teste rápido para avaliação do sêmen bovino congelado, o qual deve permanecer por 1 hora a 45°C, podendo substituir a prova lenta. Nesse teste, o sêmen deve atingir uma motilidade mínima de 20% no final da incubação². Em ovinos, quando se usa o teste de termorresistência lento (5 horas de incubação a 37°C), é aconselhável utilizar sêmen com no mínimo 30% de espermatozoides vivos no final da incubação. Moraes¹³

verificou que, diferentemente dos bovinos, os testes de termorresistência lento e rápido não são equivalentes para avaliação do sêmen ovino congelado.

A maioria dos testes realizados nos últimos anos, tentando prever a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, fundamenta-se na correlação com a fertilidade e estes procedimentos não são capazes de identificar com acurácia todas as amostras de sêmen. Para que o espermatozóide vença todas as barreiras do trato genital feminino e fecunde o óvulo, é necessário uma série de atributos, como uma morfologia e motilidade aceitáveis, capacitação, reação acrossomática, enzimas necessárias para a fecundação, um DNA compatível, dentre outros. A avaliação do sêmen buscando determinar o potencial para fecundação deveria ser realizada pelo percentual de espermatozóides que contenham todos estes atributos¹. Este trabalho teve como objetivo verificar o valor real de alguns parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino, determinado através da prenhez, após inseminação intra-uterina por laparoscopia.

MATERIAL E MÉTODO

O sêmen de 32 carneiros Corriedale foi colhido, utilizando-se vagina artificial, colocado em banho-maria a 30°C e analisado quanto ao volume, turbilhonamento, motilidade progressiva (MP), concentração e morfologia espermáticas. Os ejaculados foram aproveitados independentemente da sua condição, com exceção da concentração espermática. A congelamento foi na forma de *pellets*⁸, utilizando um diluente composto por 3,87 g de tris (Hydroximetil) aminometano; 0,533g de glicose; 2,123 g de ácido cítrico; 16 ml de gema de ovo; 5,3 ml de glicerol; 100.000 UI de penicilina; 100 mg de estreptomina e água destilada deionizada até 100 ml. Cada *pellet* foi confeccionado com um volume de 130 µl, contendo um mínimo de 100 milhões de espermatozóides. A dose inseminante foi de 50 milhões de espermatozóides.

Para o descongelamento, foram colocados dois *pellets*, por vez, em um tubo de ensaio, contendo 0,5 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, tendo-se o cuidado de agitar o tubo até o total descongelamento. A avaliação do sêmen congelado baseou-se na motilidade progressiva, no teste de termorresistência (TTR)⁶ e na morfologia espermática pós-descongelamento. A MP pós-descongelamento foi determinada através da colocação de uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula para observação microscópica (objetiva 16) e expresso em percentual. No teste de termorresistência, a motilidade de cada amostra foi avaliada em momentos predeterminados, ou seja, no descongelamento (hora 0) e após uma, duas, três, quatro e cinco horas de incubação em banho-maria a 37°C. A média da MP foi calculada a partir das percentagens obtidas nos momentos em que foram realizadas

as avaliações espermáticas (de 0 a 5 horas). Realizou-se a avaliação da morfologia espermática através da colocação de algumas gotas de sêmen descongelado num frasco contendo 1 ml de formol citrato para posterior exame em preparação úmida entre lâmina e lamínula, observada em microscópio de contraste de fase (objetiva 100) e contadas 100 células por preparação (amostra). Para efeito de cálculo, somente foram considerados os percentuais de células íntegras, portanto não se levaram em consideração os tipos de defeitos morfológicos. Para avaliação dos efeitos dos diferentes padrões de qualidade do sêmen, os ejaculados foram agrupados conforme critérios predeterminados. Para a motilidade progressiva pós-descongelamento, foram consideradas amostras com percentuais menores do que 20, entre 20 e 40 e acima de 40. A motilidade progressiva média foi alcançada mediante cálculo da média aritmética dos resultados obtidos logo após a descongelamento (hora 0) e após 1, 2, 3, 4 e 5 horas de incubação. Constituíram-se grupos com percentuais menores do que 20, entre 20 e 40 e maiores do que 40. Na motilidade progressiva, às 5 horas de incubação, os grupos foram determinados com percentuais menores de 10, entre 10 e 30 e maiores de 30. Para avaliação da percentagem de células morfolologicamente íntegras, constituíram-se grupos com percentuais menores de 40, entre 40 e 55 e mais de 55% de células morfolologicamente íntegras. Os critérios de avaliação foram considerados de maneira independente. A manutenção do sêmen descongelado, para fins de aplicação na inseminação laparoscópica, foi em banho-maria a 30°C.

Foram inseminadas 297 ovelhas Corriedale, com idade entre 2 e 6 anos, em boa condição nutricional e ginecologicamente sadias, criadas extensivamente, no município de Quaraí, na região da Campanha, do Estado do Rio Grande do Sul. Para a sincronização dosaios, as ovelhas receberam esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de MAP (acetato de medroxiprogesterona) por 12 dias, mais 400 UI de e CG (Equine Chorionic Gonadotrophin) intramuscular no momento da retirada das esponjas. As inseminações foram realizadas nos meses de março e abril, portanto em plena estação reprodutiva. As detecções deaios foram realizadas com o auxílio de 10% de machos vasectomizados, previamente submetidos a exame dos ejaculados, colhidos por eletroejaculação.

A inseminação laparoscópica foi realizada¹² em ovelhas previamente submetidas a um jejum completo de 12 horas. A contenção foi em mesas metálicas, especiais para esse fim, nas quais as ovelhas ficavam em decúbito dorso-obliquo, num ângulo de 60 graus, com a porção caudal suspensa. Posteriormente, procedeu-se a tosquia, anti-sepsia e anestesia local com 6 ml de cloridrato de lidocaína a 2% na região das punções. Para a inseminação, foi utilizado um laparoscópio Storz (H. Strattner & Cia. Ltda.). As ovelhas a serem inseminadas foram submetidas a punção por dois trocartes, 3

a 4 cm lateralmente à linha média, um de cada lado, 5 a 7 cm cranialmente ao úbere, com as punções sendo realizadas, de cada lado, em direção à cabeça do fêmur. O trocar da esquerda foi utilizado para insuflação de gás carbônico e penetração do telescópio. No trocar 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. À inseminação artificial laparoscópica, utilizou-se uma pipeta de vidro com diâmetro externo de 5 mm e interno de 3 mm, adaptada a uma seringa de 1 ml, através de uma conexão de borracha. As inseminações foram realizadas entre 58 e 66 horas depois da retirada das esponjas vaginais. Logo após a inseminação, as ovelhas receberam um repelente no local das punções. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrasonografia 40 dias após a inseminação.

As ovelhas foram sincronizadas e as inseminações implementadas variando apenas a qualidade do sêmen conforme cada parâmetro estudado. A análise estatística foi realizada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa estatístico SAS (1988). Os resultados dos diferentes valores estipulados em cada parâmetro foram comparados, utilizando-se a análise de contraste no PROC CATMOD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de sêmen em que a MP, logo após a descongelação, foi superior a 40% proporcionaram um percentual de prenhez satisfatório e mais elevado em relação às que tiveram motilidade menor, conforme demonstrado na Tab. 1. A MP média durante as 5 horas de incubação, quando inferior a 20%, proporcionou índices de prenhez insatisfatórios, de acordo com o expresso na Tab. 2. A MP às 5 horas de incubação, quando inferior a 10%, apresentou resultados inferiores aos demais, conforme Tab. 3. De acordo com a Tab. 4, obtiveram-se melhores índices de prenhez com aquelas amostras de sêmen que apresentaram uma incidência mínima de 40% de células íntegras. Nas amostras acima de 40%, não se verificou diferença, e os percentuais de prenhez foram satisfatórios.

A avaliação *in vitro* do sêmen congelado é um procedimento indispensável em qualquer programa de inseminação artificial em que se procure um resultado satisfatório que justifique todo o investimento em materiais, hormônios, técnica laparoscópica para atingir o objetivo fim que é o melhoramento genético. Quanto mais precisa e completa for a avaliação de uma partida de sêmen, tanto melhor se poderá prever sua capacidade fecundante, além do que esta avaliação é importante para o estudo de novos meios de preservação.

Na opinião de Amann¹, a maioria dos testes realizados nos últimos anos, tentando prever a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, são baseados na correlação com a

fertilidade, e esse procedimento não é capaz de identificar com acurácia a qualidade de todas as amostras de sêmen. Para que o espermatozóide vença todas as barreiras do trato genital

Tabela 1

Prenhez de ovelhas Corriedale, inseminadas intra-uterinamente, por laparoscopia, com sêmen congelado em *pellets*, nos meses de março e abril de 1992, em Quaraí (RS), conforme a motilidade progressiva (MP) pós-descongelação.

MP na Descongelação %	Ovelhas inseminadas n	Ovelhas prenhes	
		n	(%)
< 20	19	06	(31,58) ^a
20 a 40	159	81	(50,94) ^a
> 40	119	81	(68,07) ^b

a,b = valores seguidos de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,01$).

Tabela 2

Prenhez de ovelhas Corriedale, inseminadas intra-uterinamente, por laparoscopia, com sêmen congelado em *pellets*, em Quaraí (RS), nos meses de março e abril de 1992, conforme a motilidade progressiva (MP) média durante as 5 horas de incubação.

MP Média nas horas 0, 1, 2, 3, 4, e 5 de Incubação (%)	Ovelhas inseminadas n	Ovelhas prenhes	
		n	(%)
< 20	101	38	(37,62) ^a
20 - 40	149	96	(64,43) ^b
> 40	47	34	(72,34) ^b

a,b = valores seguidos de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,0001$).

Tabela 3

Prenhez de ovelhas Corriedale inseminadas intra-uterinamente, por laparoscopia, com sêmen congelado em *pellets*, em Quaraí (RS), nos meses de março e abril de 1992, conforme a motilidade progressiva (MP) às 5 horas de incubação.

MP após 5 horas de Incubação (%)	Ovelhas inseminadas (%)	Ovelhas prenhes	
		n	(%)
< 10	125	58	(46,40) ^a
10 - 30	144	88	(61,11) ^b
> 30	28	22	(78,57) ^b

a,b = valores seguidos de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,01$).

Tabela 4

Prenhez de ovelhas Corriedale, inseminadas intra-uterinamente, por laparoscopia, com sêmen congelado em *pellets*, em Quaraí (RS), nos meses de março e abril de 1992, conforme o percentual de células íntegras.

Células Íntegras (%)	Ovelhas inseminadas n	Ovelhas prenhes	
		n	(%)
< 40	46	07	(15,22) ^a
40 - 55	123	76	(61,79) ^b
> 55	128	85	(66,41) ^b

a,b = valores seguidos de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,0001$).

feminino e fecunde o óvulo, é necessário que ele tenha uma série de atributos, como uma morfologia e motilidade de tal ordem que tenha condições para sofrer capacitação e a reação acrossomática, que contenha todas as enzimas necessárias para a fecundação, bem como um DNA compatível, dentre outros. A avaliação do sêmen buscando determinar o potencial para a fecundação deveria ser realizada pelo percentual de espermatozoides que contenham todos estes atributos.

Constatou-se que a avaliação da MP pós-descongelamento é um método simples e rápido para avaliação do sêmen^{7,8,9}. No entanto, quando utilizado isoladamente, não é capaz de detectar possíveis problemas decorrentes de falhas na criopreservação que promovam lesões de membranas, nem mesmo pequenas alterações de osmolaridade e pH que se manifestem somente mediante a permanência da amostra em incubação.

Na avaliação do sêmen bovino, os testes de termorresistência lentos demonstram que há uma correlação entre o número de espermatozoides ativos após o teste e a taxa de fecundação, permitindo com isso eliminação prévia de amostras de sêmen inadequadas, ou seja, que apresentem motilidade inferior a 20% no final de incubação^{6,11}. Outro teste

de termorresistência foi preconizado por Barnabe *et al.*², no qual o sêmen permanece por uma hora a 45°C. Em ovinos, Moraes¹³ estudou os testes de termorresistência lento (37°C/5 horas) e rápido (46°C/30 minutos) utilizados para sêmen bovino, concluindo que não são equivalentes para avaliação do sêmen ovino. Os resultados obtidos neste experimento indicaram que os percentuais de células com motilidade progressiva representados pela média das avaliações, bem como a motilidade final, afetaram significativamente os resultados de prenhez.

A morfologia espermática, em especial a integridade das membranas, é um dos atributos essenciais para um espermatozoide ser fértil, por isso, a análise desse parâmetro é considerada fundamental para predição da fertilidade. Ocorrem lesões do acrossomo durante o congelamento e o descongelamento^{10,15,16}, as quais não interferem na motilidade espermática.

Conclui-se que os parâmetros motilidade pós-descongelamento, teste de termorresistência e percentual de células íntegras são eficientes para estimar a capacidade fecundante do sêmen congelado, para utilização em inseminação laparoscópica, e devem ser utilizados em conjunto.

SUMMARY

The aim of the present study was to verify some parameters for evaluating frozen semen, throughout pregnancy rate, in sheep. Two hundred and ninety-seven ewes from the Corriedale breed were inseminated by laparoscopic method. The estrus were synchronized with intravaginal sponge, containing 50 mg of MAP (medroxyprogesterone acetate), for 12 days and eCG (Equine Chorionic Gonadotrophin; 400 IU) was given in a single intramuscular injection at the moment of withdrawing the sponges. The semen from 32 rams was frozen in pellets. Semen of different qualities was used. The quality of the semen was determined by evaluating sperm motility at thawing, sperm motility after 5 hours incubation, the mean of sperm motility during incubation period (0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours) and the percentage of normal sperm cells. Each of these parameters was correlated with pregnancy after laparoscopic insemination. The diagnosis of pregnancy was performed by ultrasonography at 40 days after insemination. The percentages of pregnancy were from 60% to 80% only when the sperm samples exhibited sperm motility higher than 40% (68.1), mean of sperm motility and after thawing at least of 20% (64.4 and 72.3) and sperm motility after 5 hours of incubation superior to 10% (61.1 and 78.6). With regard to the percentage of viable cells, the samples with at least 40% of sperm motility resulted in 61.8% and 66.4% of pregnancy while sperm motility less than 40% resulted in only 15.2%. The parameters investigated were efficient to evaluate the capacity of frozen semen to fertilize sheep to use in laparoscopic insemination.

UNITERMS: Frozen semen; Intrauterine insemination; Laparoscopy; Sheep.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AMANN, R.P. Evaluation of sperm quality: Can we pick the Winners? *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 11., Belo Horizonte, 1995. *Anais*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.206-12.
- 2- BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termorresistência para avaliação de sêmen congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.4, n.3/4, p.7-12, 1980.
- 3- BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C. Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen congelado de bovinos após o descongelamento e após provas de termorresistência. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.18, p.61-8, 1981.
- 4- BONIFACINO-ARTOLA, L.A.; PERDIGON, F.; NEVES, J.P.; LUZ, S.L.N. Inseminação intrauterina por laparoscopia em ovinos com a utilização de sêmen ovino congelado. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 8., Belo Horizonte, 1997. *Anais*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p.102.

- 5- CASAGRANDE, J.F.; PINHEIRO, L.E.L.; ALMEIDA, C.A.; FERRAZ, J.B.S. A influência da motilidade e da velocidade espermática sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n.2, p.31-5, 1979.
- 6- DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valeur fecondant e du sperme congelé. **Annales de Medecine Veterinaire**, v.4, p.215-24, 1967.
- 7- EPPLESTON, J.; MAXWELL, W.M.C.; BATTYE, K.M.; ROBERTS, E.M. Effect of thawed motility and intrauterine dose of motile sperm on fertility in ewes. In: CONGRESS OF THE AUSTRALIAN REPRODUCTIVE BIOLOGY, 18., Queensland, 1986. **Anais**. Queensland: Australian Society for Reproductive Biology, 1996. p.19.
- 8- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworths, 1987. p.194.
- 9- FINDLATER, R.C.F.; HARESIN, W.; CURNOCK, R.M.; BECK, N.F.G. Effect of timing of intrauterine insemination with frozen-thawed semen on fertility in ewes. In: CONGRÉS MONDIAL DE REPRODUCTION ET SELECTION DES OVINS ET BOVINS A VIANDE, 3., Paris, 1988. **Anais**. Paris: Societé Mondial de Reproduction et Selections des Ovins et Bovins a Viande, 1988. p.194-6.
- 10- HEALEY, P. Effects of freezing on the ultrastructure of the spermatozoa of some domestic animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.18, p.21-7, 1969.
- 11- JONDET, R.; MIES FILHO, A.; RABADEUX, Y. L'épreuve de thermoresistance dans l'appréciation de la valeur du sperm bovin congelé. **Comptes Rendus des Sénas de la Societé de Biologie**, v.4, p.764, 1978.
- 12- KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination if ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.95, 1982.
- 13- MORAES, C.N. **Métodos alternativos para congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen ovino em pellets**. Rio Grande do Sul, 1996. 57p. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- 14- OSORIO, J.A.A.; MORAES, J.C.F. Identificação de critérios para a avaliação "in vitro" da qualidade do sêmen "in natura" e congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1995. **Anais**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.316.
- 15- TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrossome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, n.2, p.461-2, 1977.
- 16- WATSON, P.F.; MARTIN, C.A. A comparison of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.28, n.1, p.99-101, 1972.

Recebido para publicação: 06/03/1998
Aprovado para publicação: 19/10/1999