

# Reconcentração do sêmen congelado de carneiros por centrifugação: efeito sobre a ocorrência de refluxo da dose inseminante e a fertilidade à inseminação artificial cervical

*Ana Cláudia França de Freitas<sup>1</sup>, Yânca Bizerra Souza<sup>2</sup>, Rebeca Santos da Silva<sup>3</sup>, Halley Schuch Passos<sup>4</sup>, Gabriel Felipe Oliveira de Menezes<sup>5</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>6</sup>*

## Resumo

Por ser um procedimento prático e de baixo custo, a inseminação artificial cervical (IAC) é uma boa alternativa para a intensificação do manejo reprodutivo de ovinos. Durante sua realização a ocorrência do refluxo seminal é comum, tendo em vista a limitada capacidade volumétrica da cérvix que promove uma diminuição de espermatozoides disponíveis para o transporte até o sítio de fertilização. Objetivando reduzir o volume da dose inseminante e consequentemente do refluxo durante as inseminações cervicais, foi avaliado o uso de força centrífuga aplicada após a descongelação em palhetas com sêmen congelado de carneiros. Para tanto, foram utilizados cinco carneiros e 92 ovelhas da raça Santa Inês. A colheita de sêmen foi realizada com o auxílio de vagina artificial sendo selecionadas amostras com boa congelabilidade, as quais foram diluídas em meio glicina-gema-leite, envasadas em palhetas de 0,25 mL com concentração espermática de  $400 \times 10^6/\text{mL}$  e congeladas de forma automatizada (refrigeração a  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $5^\circ\text{C}$ , estabilização por 90 minutos, congelação a  $15^\circ\text{C}/\text{min}$  de 5 à  $-80^\circ\text{C}$ , e  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  de  $-80$  à  $-140^\circ\text{C}$  e imersão

<sup>1</sup> Médica-veterinária, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>2</sup> Graduanda em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Sergipe (UFS), bolsista Fapitec, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Médica-veterinária, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>4</sup> Médico-veterinário, mestre em Reprodução Animal, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>6</sup> Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

em nitrogênio líquido à  $-196^{\circ}\text{C}$ ). As palhetas com sêmen foram descongeladas ( $40^{\circ}\text{C}/20\text{s}$ ) e utilizadas na IAC após terem sido centrifugadas a 1000 rpm (150 g) durante 10 minutos (tratamento) ou não terem sido centrifugadas (controle). A ocorrência de refluxo da dose inseminante foi registrada observando-se a cérvix com espécuro durante 60 segundos após a IAC. A fertilidade foi obtida realizando-se o diagnóstico de gestação por ultrassom após 25 dias da inseminação. A ocorrência de refluxo do sêmen no momento da inseminação diferiu substancialmente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de fêmeas inseminadas com doses centrifugadas (19,56%) ou não (80,44%). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as taxas de prenhez das ovelhas inseminadas com o sêmen centrifugado (2,2%) e não centrifugado (0,0%) que foram muito baixas. Conclui-se que a centrifugação a 1000 rpm (150 g)/10 minutos da palheta com sêmen após sua descongelação foi eficaz em reduzir a ocorrência de refluxo no momento da inseminação artificial cervical em ovinos, todavia esse fato não foi suficiente para evitar a baixa fertilidade da técnica de IAC com sêmen congelado.

**Palavras-chave:** centrifugação, cérvix, concentração espermática, palheta.

## Introdução

A inseminação artificial cervical (IAC) apresenta-se como uma biotecnologia da reprodução de grande importância, uma vez que é menos invasiva, não necessita de mão de obra altamente especializada e equipamentos complexos e apresenta menor custo que a inseminação artificial laparoscópica (CARDOSO et al., 2009). Todavia, a IAC tem apresentado resultados de fertilidade baixos com o uso de sêmen congelado e um dos fatores restritivos é a limitada capacidade volumétrica do colo uterino da ovelha, sendo comum a ocorrência de refluxo seminal (KERSHAW et al., 2005) que provoca a diminuição da quantidade de espermatozoides disponíveis para a fecundação. Desse modo, para o emprego da IAC, faz-se necessária a utilização de doses seminais com volume reduzido e maior concentração espermática.

A centrifugação surge como uma alternativa de redução do volume da dose inseminante e manutenção do número de espermatozoides mínimo para a IAC podendo trazer algum benefício, especialmente com sêmen congelado ao eliminar agentes tóxicos do diluidor no sêmen descongelado, bem como

promover a reconcentração das células espermáticas. Até então, não se tem notícias de estratégias que usam a centrifugação da própria dose de sêmen após a descongelação para este fim. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar o uso da centrifugação da palheta com sêmen congelado de carneiros após a descongelação como meio de reconcentração espermática e redução do volume da dose inseminante sobre a ocorrência de refluxo seminal e a fertilidade à IAC.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo experimental Pedro Arle, localizado no Município de Frei Paulo, Sergipe, Brasil (Latitude: 10°36'13.73" Sul e Longitude: 37°38'5.97" Oeste). Foram utilizados ovinos da raça Santa Inês criados em regime semi-intensivo, sendo cinco reprodutores e 92 fêmeas todos em bom estado clínico e nutricional (média de escore corporal 3).

O sêmen foi colhido e avaliado de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA (HENRY et al., 2013) sendo diluído em meio Glicina-gema-leite segundo Gonzalez (1996) com modificações realizadas por Bandeira (2011) e Rodello et al. (2011) e congelado segundo Freitas (2014): sêmen diluído envasado em palhetas de 0,25 mL com concentração espermática de  $400 \times 10^6$ /mL e congeladas de forma automatizada (refrigeração a 0,5°C/min até 5°C, estabilização por 90 minutos, congelação a 15°C – de 5 à -80°C –, e 10°C/min – de -80 à -140°C –, e imersão em nitrogênio líquido à -196°C).

As fêmeas foram submetidas a protocolo de manipulação hormonal do ciclo estral por meio de dispositivos intravaginais com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Syntex Indústria Bioquímica. Buenos Aires, Argentina) durante seis dias e posterior aplicação de 400 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (ECG Novormon 5000®, Syntex S.A. Buenos Aires, Argentina) além de 45 µg de D-cloprostenol (Prolise® ARSA S.R.L, Buenos Aires, Argentina) no momento da retirada do dispositivo.

Foram realizadas inseminações artificiais cervicais (IAC) nas ovelhas  $\pm 25,54$  horas após a observação do estro natural subsequente ao estro induzido.

As palhetas de sêmen foram descongeladas a 40°C/20" e divididas em dois grupos: não centrifugado (controle) e centrifugado (tratamento) a 1000rpm (150 g) durante 10' (Centribio® – Mod. 80 2B, CentribioCo, LTDA, China). As palhetas não centrifugadas corresponderam a um volume de 250 µL e foram utilizados em 46 ovelhas. Após a centrifugação, as palhetas do grupo tratamento foram cortadas sendo descartados os 2/3 superiores e aproveitado para a IAC o restante (1/3 inferior) que continha o *pellet* de espermatozoides em um volume final de 83,3 µL. Quarenta e seis ovelhas (n=46) foram submetidas à IAC com doses inseminantes centrifugadas.

Para a IAC as ovelhas foram contidas em um tronco com os membros pélvicos elevados e imobilizados. Utilizando um espécuro tubular localizava-se a entrada da cérvix e depositava-se o sêmen no primeiro ou segundo anel cervical mantendo a ovelha na mesma posição por um minuto, para detecção da ocorrência de refluxo seminal. Passados 25 dias, realizou-se o diagnóstico de gestação com o auxílio do aparelho ultrassonográfico Mindray (DP2200Vet), com um transdutor eletrônico linear transretal de 5,0MHz (75L50EAV).

Os dados foram avaliados pelo teste Qui-quadrado com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa Sisvar 5.0.

## Resultados e Discussão

A técnica de centrifugação da palheta após a descongelação e consequente diminuição do volume da dose inseminante foi eficaz em reduzir a ocorrência do refluxo seminal durante a IAC. Foi observada maior ( $p < 0,05$ ) frequência de refluxo nas fêmeas do grupo controle (80,44%) que naquelas do grupo centrifugado (19,56%). A fertilidade obtida pela taxa de prenhez foi muito baixa não diferindo significativamente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos (controle: 0,0%; centrifugado: 2,2% correspondendo a apenas uma fêmea prenhe). Resultados baixos de fertilidade com a IAC utilizando sêmen congelado de ovinos (13,3%) também foram relatados por Cardoso et al. (2009). Moraes et al. (2007), entretanto obtiveram, em situações semelhantes, melhor taxa de prenhez que oscilou entre 20 e 30%.

Os baixos índices de fertilidade obtidos no presente trabalho impediram a realização de uma análise mais precisa do potencial de uso da centrifugação

como estratégia de reconcentração espermática da dose inseminante. É sabido que a fertilidade do sêmen congelado de ovinos é frequentemente baixa, sobretudo em inseminações cervicais. A utilização de sêmen fresco e métodos de inseminação intrauterina como a laparoscopia tem alcançado maior êxito quanto à fertilidade. Resende et al. (2015), adotando a centrifugação por densidade em sêmen ovino, além de não terem constatado alterações na viabilidade espermática, observaram taxa de prenhez média elevada (61,46%) semelhante ao grupo controle não centrifugado (72,50%). Entretanto, os referidos autores utilizaram sêmen fresco que naturalmente possui maior viabilidade que o congelado e realizaram inseminações intrauterinas por via laparoscópica que aumentam as chances de fertilização.

Outros autores, utilizando a mesma metodologia de reconcentração por meio da centrifugação da palheta com sêmen ovino após a descongelação, verificaram que a cinética e a viabilidade espermática após a centrifugação (1000 rpm – 150 g/10') não diferiram quando comparado ao grupo controle (não centrifugado). Entretanto, observou-se que a quantidade de espermatozoides reagidos e capacitados foi maior nas amostras centrifugadas (FREITAS et al., 2014), o que pode ser um indício de menor tempo de vida útil destas células.

## Conclusões

A centrifugação da palheta após a descongelação foi eficiente em concentrar os espermatozoides e reduzir o volume da dose inseminante e conseqüentemente diminuir a ocorrência de refluxo. No entanto, o procedimento não evitou a baixa fertilidade decorrente da inseminação artificial cervical com sêmen congelado, havendo a necessidade da realização de novos testes a fim de desenvolver a estratégia e viabilizar o uso da inseminação artificial cervical.

## Agradecimentos

À Fapitec pela concessão da bolsa e à TK Equipamentos para Reprodução.

## Referências

CARDOSO, E.; CRUZ, J. F. da; FERRAS, R. C. N.; NETO, M. R. T.; SANTOS, R. S. dos. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 217-222, abr.-jun. 2009.

BANDEIRA, A. M. P. **Utilização da gelatina na refrigeração e congelamento do sêmen ovino**. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

HENRY M., NEVES J. P., JOBIM M. I. M. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 104 p.

FREITAS, A. C. F. de. **Avaliação do sêmen de carneiros submetido à reconcentração por centrifugação da palheta pós-descongelamento**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

GONZALEZ, C. I. M. **Avaliação "in vitro" e "in vivo" de sêmen ovino (Ovis aries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores**. 1996. 135 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H. de; JAUME, M. C.; **Alternativa para inseminação artificial cervical superficial com sêmen congelado em ovinos**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2007. 2 p. (Embrapa Pecuária Sul. Comunicado Técnico, 62).

RESENDE, M. V.; BISCARDE, C. E. A.; MARTINS, L. E. P.; KIYA, C. K.; LIMA, V. F. M. H. de; GUSMÃO, A. L. Centrifugação de espermatozoides ovinos em gradiente de densidade contínuo: efeito sobre a taxa de prenhez e proporção do sexo. *Ciência Animal Brasileira*, v. 16, n. 1, p. 125-132, jan./mar. 2015.

RODELLO, L.; BICUDO, S. D.; FALLEIROS, M. B.; MONTEIRO, C. D.; SAKASHITA, S. M. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no Meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e Integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 239-248, 2011.