

HYMERSON COSTA AZEVEDO

**MÉTODOS E TÉCNICAS PARA VIABILIZAR A
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL COM
SÊMEN CONGELADO EM OVINOS**

Monografia apresentada à disciplina Seminários I, do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Docentes responsáveis: Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Botucatu

Abril - 2002

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	03
1. INTRODUÇÃO	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Aspectos anátomo-fisiológicos da cérvix ovina	05
2.2. Desempenho da IA transcervical com sêmen congelado	09
2.2.1. Habilidade do espermatozóide ovino congelado	09
2.2.2. Concentração espermática	10
2.2.3. Fatores que influenciam o grau de dilatação cervical.....	11
2.2.4. Métodos mecânicos de dilatação cervical	13
2.2.5. Métodos farmacológicos de dilatação cervical.....	16
2.2.6. Melhoramento genético e dilatação cervical.....	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR = Dispositivo intravaginal de liberação controlada de droga

eCG = Gonadotrofina coriônica eqüina ou Gonadotrofina sérica da égua prenhe

hull-8 = Interleucina humana 8

IA = Inseminação Artificial

PGE = Prostaglandina E

PGF_{2a} = Prostaglandina F_{2α}

PGFM = 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandina F_{2α}

1. INTRODUÇÃO

Para a obtenção de melhores resultados da inseminação artificial (IA) em ovinos, com o sêmen congelado, faz-se necessário à deposição do sêmen próximo ao sítio de fertilização. A IA por laparoscopia em ovinos vem permitindo a utilização do sêmen congelado, através da sua deposição diretamente no útero, propiciando índices de prenhez semelhantes aos obtidos com monta natural (Maxwell & Hewitt, 1986; Souza, 1993). Entretanto a IA por laparoscopia exige equipamentos e pessoal especializado (Souza, 1993; Naqvi et al., 1998) além de criar preocupações quanto ao bem estar animal (Croy et al., 1999) restringindo o seu uso a plantéis selecionados (Souza, 1993; Naqvi et al., 1998). A via natural de acesso ao útero que seria a via transcervical é de difícil adoção na espécie, já que a cérvix ou colo uterino constitui um dos maiores obstáculos à passagem de instrumentos por ser de difícil dilatação, ter estrutura rígida, ser longa e bastante fechada (Halbert et al., 1990; Croy et al., 1999).

A IA laparoscópica não é, na maioria das vezes, possível em nível comercial sendo que a técnica transcervical pode ser mais facilmente adotada e usada por produtores (Godfrey et al., 1999). O desenvolvimento de um programa de IA economicamente viável destinado a um maior número de rebanhos, com sêmen congelado, depositado intrauterinamente através da cérvix, permitiria um aproveitamento mais racional de carneiros geneticamente superiores (Halbert et al., 1990; Souza, 1993; Sayre & Lewis, 1996).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos anátomo-fisiológicos da cérvix ovina

A cérvix tem diversas funções no processo reprodutivo, facilita o transporte espermático através do muco cervical para o interior do útero, atua como reservatório de espermatozoides e pode tomar parte na seleção de células espermáticas viáveis, impedindo assim a passagem daquelas inviáveis e defeituosas (Hafez, 1995). Anatomicamente a cérvix ovina é um órgão fibroso que tem uma longitude de quatro (4) a sete (7) centímetros, conecta o útero com a vagina (Evans e Maxwell, 1990) e é composto predominantemente de tecido conjuntivo e muito pouco tecido muscular (Evans e Maxwell, 1990; Hafez, 1995). Desde que as propriedades do tecido conjuntivo dependem do tipo, da concentração e das interações das moléculas que compõem a matriz extracelular, as características funcionais da cérvix são alteradas dramaticamente pelas modificações nestes parâmetros (Hafez, 1995).

A cérvix caracteriza-se por uma espessa parede e uma luz constricta sendo que o canal cervical é formado por várias proeminências. Nos ruminantes estas têm a forma transversa ou espiralada com saliências fixas conhecidas por anéis anulares. Na ovelha adaptam-se um ao outro, ocluindo a cérvix com segurança (Hafez, 1995). Esta oclusão tem como objetivo trancar a comunicação entre o útero e a vagina para se evitar grande número de infecções (Evans e Maxwell, 1990). A cérvix permanece firmemente fechada, exceto durante o cio, quando se relaxa levemente, permitindo a entrada dos espermatozoides no útero (Evans e Maxwell, 1990; Hafez, 1995) e durante o trabalho de parto para permitir a passagem da cria (Hafez, 1995). É importante lembrar que a vagina da ovelha contém pregas as quais podem produzir espaços cegos ao redor da entrada da cérvix. O reconhecimento destas pregas é fundamental para que se possa introduzir a pipeta de IA no interior do anel externo da cérvix (Halbert et al., 1990).

O tecido conjuntivo do estroma cervical é feito de substância básica, de constituintes fibrosos e de elementos celulares. A substância básica contém proteoglican e ácido hialurônico, sulfato de codroitina-4-6, sulfato dermatânico, sulfato heparâmico e sulfato de ceratan associados com proteínas. Os constituintes fibrosos incluem colágeno, elastina e reticulina. Os elementos celulares compreendem mast células, fibroblastos, e células errantes. O colágeno é feito de cadeias de vários aminoácidos como a glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidrolisina. Os padrões de reticulina, elastina, e substâncias interfibrasas básicas facilitam a dilatação da cérvix no momento do parto. A dissociação das fibras colágenas, que se separam acentuadamente umas das outras, provoca o afrouxamento dos tecidos cervicais e aumenta de maneira muito clara os espaços entre os feixes de colágenos (Hafez, 1995).

Durante a gestação, a cérvix pode apresentar até oito vezes o seu tamanho em massa. O crescimento aumentado e a concentração diminuída dos componentes das matrizes podem ser conseqüência de vários fatores, incluindo vascularização aumentada associada a um influxo de células inflamatórias (Hafez, 1995). Em gestações normais, o amolecimento cervical antecede a dilatação cervical e nascimento. Um influxo de neutrófilos no interior da cérvix parece ser um importante componente para o amolecimento cervical (Owiny et al., 1995). É postulado que colagenases, liberadas por neutrófilos recrutados, sejam importantes para a destruição das fibras de colágenos (Westerhausen-Larson et al., 1996).

Na tentativa de se desenvolver a técnica de IA transcervical torna-se crucial o exame total da anatomia da cérvix e do canal cervical. Estudos da anatomia da cérvix ovina conduzidos por Halbert et al. (1990) em ovelhas da raça Suffolk, Cheviot, Dorset entre outras e por Souza (1993) em ovelhas das raças Ideal e Corriedale, reportaram que o canal cervical apresentou-se com as seguintes características gerais: uma porção caudal de entrada pelo orifício cervical externo,

uma porção medial em que as dobras foram maiores e mais excêntricas e uma porção cranial, próxima ao corpo uterino, onde já não se observou uma estrutura tão evidente das dobras cervicais. Segundo os autores, a distribuição irregular e excêntrica das dobras dentro do canal cervical resulta numa luz cervical reduzida, dificultando a passagem de instrumentos inseminantes.

Segundo Halbert et al. (1990), a prévia classificação do canal cervical poderia ser usada para prever o desempenho na transposição da cérvix durante a IA transcervical. Neste sentido, os autores citados classificaram anatomicamente o orifício cervical externo das ovelhas em quatro tipos básicos: “flap” ou aba, bico de pato, espiral e roseta. Foi verificado, de um modo geral, e para todas as raças estudadas (Suffolk, Cheviot, Dorset entre outras), uma maior frequência do tipo roseta (35%) e flap (35%). As classificações dos tipos bico de pato e espiral foram dadas em 30% das cérvixes examinadas. Entretanto estes resultados não indicaram uma clara relação entre os tipos e o comprimento, número de anéis presentes ou a largura do ponto mais estreito e do mais largo da cérvix, sendo assim, um inseminador não poderia usar a classificação dos orifícios externos das cérvixes para prever diferenças do canal de ovelhas inseminadas.

Souza (1993) também pesquisou a incidência dos mesmos tipos de aberturas do orifício cervical externo, segundo a classificação de Halbert et al. (1990), em ovelhas Corriedale inseminadas por via cervical, verificando uma frequência acentuada para o tipo flap (69,12%). Avaliando ainda formas de aberturas cervicais de 272 genitais provenientes de ovelhas das raças Ideal e Corriedale, a autora observou novamente uma predominância do tipo flap (52,21%) em relação aos demais tipos, sendo que não foi verificada diferença na forma e frequência dos colos entre as raças. A predominância do tipo flap observada foi bem acima daquela descrita por Halbert et al. (1990).

Souza (1993) ainda, observou diferença estatística no comprimento cervical médio entre as duas raças ($5,91\pm 0,91\text{cm}$ e $5,65\pm 0,81\text{cm}$ para as raças Ideal e Corriedale respectivamente). Os diâmetros cervicais das duas raças estudadas alcançaram uma média de $0,80\pm 0,12\text{cm}$ e $0,79\pm 0,12\text{cm}$, respectivamente para as raças Ideal e Corriedale, sendo que a diferença entre as raças não foi significativa. Houve correlação entre o comprimento e o diâmetro cervicais para as duas raças indicando crescimento das duas variáveis no mesmo sentido. As cérvices examinadas apresentaram um número de dobras variável com um mínimo de 3 e um máximo de 9. As médias obtidas foram $4,89\pm 1,07\text{cm}$ e $4,56\pm 0,72\text{cm}$ para as raças Ideal e Corriedale havendo diferença significativa entre as raças. Houve correlação também entre o comprimento e o número de dobras indicando um relacionamento proporcional. O diâmetro e o número de dobras aumentaram ou diminuíram, de acordo com as variações do comprimento, como já era esperado.

Uma vez que as características anatômicas da cérvix ovina apresentam diferenças entre as raças, o conhecimento da estrutura cervical dos diversos genótipos, poderá permitir maior ou menor facilidade de transposição da cérvix, com efeitos diretos na prenhez (Halbert et al., 1990; Souza, 1993) o que pode contribuir para o desenvolvimento de programas comerciais de IA usando a técnica transcervical (Halbert et al., 1990).

O desenho dos instrumentos assim como as técnicas de passagem transcervical precisam superar essas dificuldades. As pregas que circundam a entrada da cérvix têm diferentes padrões e, reconhecer estes padrões, pode fazer com que a introdução de instrumentos fique mais fácil. O ponto mais estreito do canal em média, irá limitar o diâmetro dos instrumentos que podem ser utilizados. Os anéis excêntricos são os mais difíceis de serem transplantados e, a distância do mais excêntrico anel, deve influenciar no desenho da ponta do instrumento de IA. A localização no canal do anel mais excêntrico e a média de comprimento e número de anéis, são importantes para o desenvolvimento do

método de manipulação dos instrumentos através do canal cervical (Halbert et al., 1990).

2.2. Desempenho da IA transcervical com sêmen congelado

Até relativamente pouco tempo o sêmen congelado de carneiro estava limitado aos programas comerciais de IA. Isto se deveu aos baixos coeficientes de cordeiros que se obtinham com a aplicação do sêmen congelado na cérvix. Um grande número de pesquisadores tem estudado a fertilidade do sêmen congelado de ovinos e, na grande maioria dos casos, se tem obtido índices médios de fertilidade de 25 a 45% (Neves et al., 1983; Maxwell & Hewitt, 1986; Mies Filho et al., 1988), cifras distantes daquelas que se obtém com sêmen fresco ou resfriado, tanto diluído como sem diluir que geralmente são acima de 50% (Harvey et al., 1986; Mies Filho et al., 1988; Evans e Maxwell, 1990; Garde et al., 1993; Mies Filho et al., 1993).

2.2.1. Habilidade do espermatozóide ovino congelado

O maior fator limitante da inseminação transcervical em ovelhas com sêmen congelado é a inabilidade do espermatozóide ovino em atravessar a cérvix após ser submetido à congelação e descongelação (Windsor, 1995). A fertilidade relativamente baixa do sêmen congelado, depois da inseminação artificial cervical, está relacionada com a reduzida viabilidade dos espermatozoides congelados-descongelados. Existem muitas dificuldades para se obter uma população de espermatozoides viáveis suficiente na cérvix e seu transporte através desta e do útero para chegar ao oviduto. Em último caso, são poucos espermatozoides viáveis e/ou sem danos que chegam ao lugar da fertilização o que faz reduzir a fertilidade (Evans e Maxwell, 1990). A natureza exata das mudanças celulares que causam este problema são ainda indefinidas.

Diferentemente do sêmen fresco, que produz uma taxa de concepção aceitável na inseminação cervical ou vaginal, o sêmen congelado, precisa ser depositado no interior do útero para alcançar uma fertilidade adequada (Windsor, 1995). Maxwell & Hewitt (1986) comparou técnicas de inseminação com sêmen congelado em ovelhas Merino e observou diferença na taxa de prenhez entre as inseminações vaginais, cervicais e intrauterinas (17,2; 30,1 e 60,6% respectivamente).

Windsor (1997), conduziu vários experimentos onde inseminava, por via transcervical ovelhas Merino sincronizadas, obtendo uma média total de taxa de gestação baixa, em torno de 6,5% (32/491). Num dos experimentos, porém, no qual as ovelhas foram inseminadas com sêmen de diversos reprodutores, a fertilidade dos diferentes carneiros variou de 10,3 a 32,6%, enquanto que houve uma grande variação individual entre ejaculados (0 a 60%). Provavelmente os modelos de variação na fertilidade dos ejaculados podem diferir entre sêmen depositado por via cervical ou por laparoscopia. Em ambos os casos o sêmen precisa ser capaz de fertilizar o ovo e produzir embriões viáveis, porém, no caso de inseminação cervical, o sêmen precisa ter sucesso também na transposição da cérvix para alcançar o sítio de fertilização. O mesmo sêmen então, não necessariamente promoverá a mesma fertilidade para ambas as técnicas.

2.2.2. Concentração espermática

Se for utilizada a IA cervical com sêmen congelado-descongelado, o problema de fertilidade reduzida pode ser compensado pela utilização de sêmen que contenha uma alta concentração de espermatozóides móveis ou aprofundando-se a inseminação pela cérvix. No primeiro caso é preciso uma diluição baixa antes da congelação e uma boa reativação no momento da descongelação (Evans e Maxwell, 1990).

Neves et al. (1983), obtiveram taxas de concepção maiores para ovelhas inseminadas com sêmen congelado na concentração de 100 e 150 x 10⁶ espermatozóides totais (34,7 e 37,8%) comparado àquelas que receberam 50 x 10⁶ espermatozóides totais (23,4%). Já Maxwell & Hewitt (1986), obtiveram taxas de gestação maiores para aquelas ovelhas que receberam doses inseminantes congeladas com 600 x 10⁶ espermatozóides totais comparado àquelas que receberam 100 x 10⁶ espermatozóides totais, todas por via transcervical (41,7 e 30% respectivamente).

2.2.3. Fatores que influenciam o grau de dilatação cervical

A principal limitação na aplicação das tecnologias da reprodução em ovinos tem residido na inabilidade em se relaxar ou dilatar a cérvix (Croy et al., 1999). Na ovelha, com freqüência é possível praticar a deposição do sêmen com profundidade acima de um cm no canal cervical devido à estrutura anatômica da cérvix (Evans e Maxwell, 1990) porém, para a utilização do sêmen congelado, isto, na maioria das vezes, não é suficiente. O grau de facilidade em transpor a cérvix pode variar de acordo com vários fatores como efeito individual, estágio reprodutivo, intervalo pós parto, ordem de parto, estação reprodutiva, experiência do técnico entre outros (Husein et al., 1998).

Windsor (1995) testou vários fatores que teriam ligação direta com o grau de penetração cervical por instrumentos de inseminação em ovelhas Merino. O autor não constatou influência significativa do intervalo pós-parto na taxa de penetrabilidade cervical nos diferentes momentos pós-parto estudados (76,7, 66,7, 63,2, 64,3, 57,2% de transposição da cérvix de ovelhas a 14, 17, 20, 23 e 26 semanas pós-parto respectivamente), talvez, segundo ele, intervalos menores mostrassem influência a despeito do que aconteceu com Husein et al. (1998) que obteve 100% de inseminações intra-uterinas em ovelhas com 3 meses de pós-parto. Em outro experimento, Windsor (1995) realizou três tentativas de passagem do aplicador para cada ovelha para se verificar a repetibilidade da penetração

cervical sendo verificado que mais de 75% das ovelhas tiveram o mesmo resultado. O teste de regressão mostrou que não houve nenhuma interação entre a ovelha individualmente e o resultado de cada tentativa de penetração, indicando que o primeiro resultado obtido por qualquer ovelha é factível de repetição. Esta falta de interação, segundo o próprio autor, indica que a penetrabilidade cervical é influenciada pela variação individual e não por fatores do acaso.

Windsor (1995), verificou também, que a taxa de penetração cervical aumentava quanto maior era o número de partos de uma ovelha (21,1; 41,2 e 43,4% para ovelhas com 1, 2 e 3 partos respectivamente). Este fato era esperado em vista do estiramento cervical extensivo que ocorre em cada parição. Segundo o autor, o dado sugere que em alguns rebanhos e sistemas de reprodução, pode ser inteligente a estratégia de excluir dos programas de IA transcervical, ovelhas que tenham tido apenas um parto ou bem aquelas que nunca pariram.

Quanto à condição reprodutiva da ovelha, Windsor (1995) não identificou diferença na penetrabilidade cervical entre ovelhas submetidas a dois métodos de sincronização de estro (progéstágeno/esponja + PMSG vs. 2 aplicações de PGF2 α + PMSG) e entre estas e aquelas em estro natural (62,8, 64,0 e 80,0% respectivamente), mas detectou influência significativa da estação reprodutiva na penetrabilidade cervical, sendo que houve um maior franqueamento cervical na estação reprodutiva comparado à estação não-reprodutiva (80,5 e 30,6% respectivamente).

Husein et al. (1998), conduziram um experimento em que ovelhas foram inseminadas com sêmen congelado após serem sincronizadas e receberem eCG no momento da remoção das esponjas. Os autores obtiveram uma taxa de prenhez de 70% nas ovelhas tratadas com eCG demonstrando que a técnica de IA transcervical usando sêmen congelado pode produzir resultados satisfatórios fora da estação reprodutiva. Os bons resultados são atribuídos também a uma alta taxa de penetração cervical, já que a deposição intrauterina do sêmen pôde ser

realizada em todas as ovelhas, o que talvez, segundo os autores, seja explicado pelo fato do técnico que realizou as inseminações ter bastante experiência e as ovelhas estarem com três meses de paridas. Em adição, foi verificado que o tempo gasto para transplantar a cérvix foi menor naquelas ovelhas que expressaram estro comparado com aquelas que não expressaram. O tempo necessário para transposição cervical foi em média de 4,7 min e 6,7 min para ovelhas em estro e anestro respectivamente.

Godfrey et al. (1999) avaliando três métodos de sincronização do estro, inseminaram ovelhas pela via transcervical. No grupo sincronizado com $\text{PGF}_{2\alpha}$, 45% das ovelhas que exibiram estro foram inseminadas no útero e 55% na cérvix, as ovelhas que não exibiram estro foram inseminadas na cérvix. A taxa de concepção foi de 8,7% (2/23) do total de ovelhas e 10% (2/20) se considerarmos apenas aquelas que entraram em cio. No grupo das ovelhas sincronizadas com Dispositivo Intravaginal de Liberação Controlada de Droga (CIDR), 52,9% das ovelhas que exibiram estro foram inseminadas no útero enquanto que 47,1% foram inseminadas na cérvix. No total, 52,9% das ovelhas conceberam à primeira IA, duas das quais foram inseminadas na cérvix. Como houve somente uma pequena diferença no índice de penetrabilidade cervical em ovelhas que exibiram estro após tratamento com CIDR ou $\text{PGF}_{2\alpha}$, a diferença na taxa de concepção (52,9 vs. 10%) foi possivelmente devido a outros fatores.

2.2.4. Métodos mecânicos de dilatação cervical

Os soviéticos têm conseguido fertilidade ao parto de 60 a 65% depois de depositar o sêmen numa profundidade de 2,5 a 3,0 cm dentro da cérvix, mediante o uso de uma pipeta helicoidal (espiral). Entretanto este tipo de pipeta não é fácil de usar e só se pode introduzir à profundidade indicada em uma pequena proporção (5-8%) de animais (Evans e Maxwell, 1990).

Uma alternativa satisfatória tem sido a utilização de pipetas com a ponta angulada (Evans e Maxwell, 1990). Experiências de sucesso na IA transcervical em ovinos tem sido relatadas com o uso de agulhas anguladas como a agulha de Cassou modificada utilizada num sistema desenvolvido na Universidade de Guelph no Canadá, chamado de Sistema Guelph de IA Transcervical (GST-AI), com relatos de taxas de penetrabilidade cervical chegando a 75% e taxas de concepção similares à IA por laparoscopia (Halbert et al., 1990 e Buckrell et al., 1992 apud Naqvi et al., 1998).

Naqvi et al. (1998), utilizando-se de uma agulha, por eles modificada, adaptada ao aplicador (soldada na ponta e entortada a um ângulo de 45 graus com uma abertura próxima à extremidade cega para a passagem do sêmen), inseminaram ovelhas adultas múltiparas da raça Malpura. Antes das inseminações as ovelhas eram colocadas num tronco adaptado para que as mesmas fossem posicionadas dorsalmente num ângulo de 30 graus. De um total de 47 tentativas de penetração cervical, 44,7% tiveram êxito alcançando o útero, em 40,4% das vezes a porção média da cérvix foi alcançada e em apenas 14,8% o local de penetração foi o orifício externo da cérvix. Os autores testaram ainda o efeito do momento da IA após o estro (≤ 6 e 18 horas) sobre a penetrabilidade cervical, não verificando influência. As taxas de fertilidade ao parto de ovelhas inseminadas no útero e na porção média da cérvix não diferiram, sendo superiores em comparação àquelas realizadas na entrada da cérvix. A fertilidade ao parto geral obtida neste trabalho foi baixa (22,7%). Os autores justificam os resultados relatando que a raça Malpura usada no experimento é de menor porte que outras raças como as australianas e que as baixas taxas de penetrabilidade cervical podem ser atribuídas à diferenças na estrutura cervical da ovelha. Segundo eles, outro fato que pode ter contribuído para estes resultados pode estar relacionado à falta de experiência na técnica de IA transcervical. Windsor (1997), usando uma pipeta plástica com a ponta curva em inseminações transcervicais em ovelhas Merino sincronizadas hormonalmente também obteve baixos índices de gestação (6,5%).

Campbell et al. (1996), inseminaram ovelhas transcervicalmente comparando duas diferentes agulhas, a agulha comercial utilizada no Sistema Guelph (agulha de Cassou modificada) e uma agulha de 19G de 8,89 cm modificada (soldada na ponta e entortada em 45 graus a 10 mm da ponta com um orifício aberto lateralmente próximo à sua extremidade). Os resultados mostraram que o útero foi atingido em 31,6% das vezes com a agulha não modificada e 20% com a agulha modificada. Entretanto a agulha modificada atingiu a cérvix mais vezes (70%) que a agulha não modificada (36,8%). Em adição, observou-se que a agulha não modificada atingiu partes fora do trato reprodutivo mais vezes (31,6%) que a agulha modificada (10%). Os resultados deste trabalho sugerem que a agulha modificada foi mais benéfica, pois propiciou que o operador atingisse o trato reprodutivo mais vezes comparado à agulha não modificada.

Na busca de novos equipamentos para IA que sejam mais eficazes em transpor a cérvix ovina recomenda-se maiores cuidados com o manuseio do genital da fêmea, com a finalidade de reduzir ao mínimo o tempo, o estresse e os eventuais traumatismos (Souza, 1993). Neste sentido, Campbell et al. (1996), estudaram o efeito histológico no trato reprodutivo de ovelhas inseminadas transcervicalmente por duas diferentes agulhas anguladas com ponta cega, sendo constatado que, o dano ao tecido de ovelhas cuja agulha alcançou a cérvix e aquelas que alcançaram o útero, foi maior que aquelas cujas agulhas não atingiram o trato reprodutivo.

Geralmente, associado à utilização de instrumentos de inseminação modificados, tem se aplicados outros métodos mecânicos de transposição cervical como a tração do colo uterino. Souza (1993), testou dois métodos de inseminação transcervical com sêmen congelado sob estro natural usando um aplicador e agulha de Cassou como segue: grupo-1 - duas inseminações espaçadas de 8 horas sem tração da cérvix; grupo-2 – uma única inseminação com tração da região adjacente do orifício cervical com uma pinça segundo Cassou e; grupo-3 –

controle, inseminação laparoscópica. O grau de penetração cervical foi avaliado numa escala crescente de 0 a 3 sendo: 0 - sem ultrapassar o orifício externo da cérvix, 1 - terço caudal da cérvix, 2 - terço médio da cérvix e 3 – terço cranial da cérvix ou lúmen uterino. Para o grupo inseminado sem tração foi obtido menor grau de profundidade: 23,7, 57,9, 14,5 e 4,0% para grau 0, 1, 2 e 3 respectivamente. Para o grupo inseminado com tração foi obtido maior profundidade cervical em decorrência da distensão do canal com suas dobras. As freqüências para os diferentes graus de penetração foram: 10,0, 41,7, 23,3 e 25,0% para grau 0, 1, 2 e 3 respectivamente. Apesar disso, na IA com tração e sem tração, os percentuais de prenhez alcançados (45% e 28,95%) não foram influenciados pelo grau de penetração cervical superficial (grau 0 e 1) ou profundo (graus 2 e 3). O grupo controle inseminado por laparoscopia alcançou um índice de prenhez de 57,14%, superior apenas ao alcançado pela IA sem tração, e semelhante ao da IA com tração. Sendo assim, a autora recomenda a IA transcervical com tração como uma melhor alternativa frente à laparoscopia, ressaltando os cuidados que se deve ter com este tipo de procedimento.

2.2.5. Métodos farmacológicos de dilatação cervical

Alguns compostos químicos têm sido utilizados com o objetivo de provocar o relaxamento da cérvix ovina, tais como a relaxina e a cocaína, a oxitocina e as prostaglandinas e as interleucinas. Segundo Evans e Maxwell (1990) resultados desanimadores têm sido obtidos com a aplicação de relaxina ou cocaína para dilatar a cérvix de ovinos. Já a oxitocina parece estar envolvida diretamente no amolecimento da cérvix, apesar de que o exato mecanismo de sua ação não estar claro (Sayre & Lewis, 1996; Sayre & Lewis, 1997).

Sayre & Lewis (1996), constataram que a dilatação cervical provocada pela oxitocina aumentou a profundidade de penetração cervical em ovelhas após sua aplicação endovenosa. A taxa de penetração cervical foi de 0% para aquelas ovelhas que não foram tratadas. Um total de 60% das ovelhas que receberam as

doses de 50 e 100 unidades USP, e 100% das que receberam 200 e 400 unidades USP de oxitocina, permitiram a transposição cervical. Através de laparoscopia, os autores constataram uma tetania uterina após a aplicação de oxitocina, entretanto, este fato não teve influência sobre o transporte do espermatozóide até o oviduto. O número de espermatozóides contados nos cornos uterinos e ovidutos, não diferiu entre ovelhas tratadas com diferentes doses de oxitocina e entre as ovelhas não tratadas. Os autores relataram também um aumento da concentração de 13,14-dihydro-15keto-prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGFM) circulante, resultante da aplicação da oxitocina na jugular de ovelhas e, levantaram a hipótese de que a mesma poderia estar envolvida no mecanismo de dilatação cervical estimulando a liberação de prostaglandinas pelo útero e cérvix.

Sayre & Lewis (1997), dando continuidade aos experimentos com oxitocina, realizaram inseminações intrauterinas em ovelhas 30 minutos após terem recebido 200 unidades USP de oxitocina. Das ovelhas controle, tratadas com solução salina e inseminadas transcervicalmente, 80% permitiram a deposição do sêmen apenas no orifício externo da cérvix enquanto que, em 20%, foi possível passar o aplicador através da cérvix. Já no grupo que recebeu oxitocina, 80% das ovelhas permitiram a deposição do sêmen intrauterinamente enquanto que as restantes foram inseminadas no orifício externo da cérvix. Apesar da oxitocina não ter afetado a taxa de fertilização, verificou-se um maior número de células embrionárias em ovelhas tratadas comparado àquelas que receberam solução salina (7,9 vs. 6,8 células/embrião, respectivamente). A qualidade do embrião não diferiu com o tratamento com oxitocina, sendo que o número de espermatozóides acessórios também não diferiu entre os tratamentos.

Há vários possíveis mecanismos de ação da oxitocina na dilatação cervical. A primeira teoria, baseada no fato de que a musculatura uterina é contínua com a da cérvix, seria de que a oxitocina estimularia as contrações uterinas que por sua vez provocariam também a contração da cérvix e posteriormente sua dilatação. Esta afirmação estaria descartada pois, como relatado anteriormente, foi

constatado que a oxitocina provoca tetania uterina após a sua aplicação endovenosa. A segunda teoria seria que a oxitocina agiria sobre a cérvix, provocando sua dilatação, através do desencadeamento de um processo enzimático colagenolítico. Porém o efeito da oxitocina é muito rápido, aproximadamente 10 min, o que faz acreditar que a dilatação não é resultado apenas de um aumento da atividade da colagenase. Talvez a dilatação da cérvix, provocada pela oxitocina, seja resultado da combinação de efeitos nas mudanças da estrutura do colágeno cervical e a tetania das contrações uterinas (Sayre & Lewis, 1996).

Como relatado anteriormente, outra substância que poderia induzir a dilatação cervical seriam as prostaglandinas. As prostaglandinas poderiam aumentar a atividade da colagenase, a qual provocaria o amolecimento do colágeno cervical, levando a cérvix a uma dilatação ao ponto de permitir a IA transcervical (Sayre & Lewis, 1996). Neste sentido, Mies Filho et al. (1993), testaram a utilização de pressários impregnados com prostaglandina-E (PGE) em ovelhas 12 horas após o aparecimento do estro e inseminadas transcervicalmente com sêmen congelado 24 horas depois do estro. Em apenas 15% das ovelhas foi possível o cateterismo cervical parcial e, em nenhuma delas, o lúmen uterino foi alcançado. No que tange a fertilidade, o percentual de não retorno foi similar, sendo de 27% para o sêmen congelado utilizando a PGE e de 35% para o grupo controle que não recebeu o pressário com PGE.

Ainda com o objetivo de viabilizar a IA transcervical em ovelhas, Croy et al. (1999), tentaram determinar se a interleucina humana 8 (hIL-8), administrada através de um supositório vaginal, promovia a proliferação de neutrófilos e se poderia induzir a um edema cervical, a uma elevação de enzimas associadas aos neutrófilos ou a uma reorganização tecidual e conseqüentemente relaxamento da cérvix de ovelhas múltiparas ao estro. Segundo os autores, a atividade da hIL-8 no recrutamento de neutrófilos ovinos para os tecidos reprodutivos in vivo foi confirmada, visto que 87,5% das fêmeas tratadas tinham elevadas proporções de

neutrófilos (>50%) na citologia vaginal. Entretanto a presença de neutrófilos na vagina não foi correlacionada com o recrutamento de neutrófilos na cérvix. O uso clínico da hull-8 nas ovelhas não promoveu o maior franqueamento da cérvix, visto que em nenhuma das ovelhas tratadas foi possível franquear-se a cérvix até o útero.

2.2.6. Melhoramento genético e dilatação cervical

Durante a IA transcervical é importante que o operador seja capaz de prever o local de posicionamento da agulha no trato reprodutivo para que a técnica seja viável. Campbell et al. (1996), identificaram uma alta correlação (79 e 92%) entre a predição do operador e o verdadeiro local da agulha sugerindo que é possível determinar aonde, no trato reprodutivo, a agulha de IA está localizada. Diante disso é possível manipular as ovelhas antes do manejo de inseminação para determinar o grau de dificuldade em transpor a cérvix para cada indivíduo. Este fato pode viabilizar a implementação de uma estratégia para elevar a taxa de penetrabilidade da cérvix dos ovinos selecionando-se certas classes de ovelhas para inseminação transcervical (Windsor, 1995).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos mais variados resultados obtidos com a inseminação transcervical em ovinos utilizando sêmen congelado, podemos afirmar que ainda não existe uma tecnologia unânime, principalmente para ser adotada em rebanhos comerciais. Enquanto não for desenvolvida uma técnica de fácil aplicação e de baixo custo para a IA em ovinos, teremos que nos contentar em observar dispersos relatos de sucesso de técnicas em condições experimentais, reclusas a universidades e laboratórios de centros de pesquisa, e a inúmeros relatos de insucesso da sua aplicação prática em nível de campo.

Aparentemente, sistemas mais acelerados de reprodução podem beneficiar a aplicação da IA transcervical, já que ovelhas com poucos meses pós-parto, propiciam a transposição cervical. Entretanto, em países subdesenvolvidos como o Brasil, o sistema mais tradicional ainda é o anual, com intervalo entre partos de 12 meses. Em adição, a utilização de ovelhas que já pariram pelo menos uma vez, associada à utilização de inseminadores experientes e métodos eficazes de sincronização do estro, assim como de doses inseminantes com concentrações espermáticas maiores, podem aumentar a eficácia da técnica a níveis satisfatórios.

Dentre os métodos mecânicos de dilatação cervical, a tração da cérvix parece ser um caminho natural, porém demanda certa habilidade e cuidado com a higidez do animal. As modificações de equipamentos, também parecem ser benéficas, no entanto devem evoluir sempre respaldadas nos estudos anátomo-fisiológicos da cérvix ovina que, por sua vez, deve ser realizado individualmente para todas as raças. Quanto aos métodos farmacológicos, a oxitocina é o produto que tem se mostrado mais eficiente. Se bem associada aos fenômenos fisiológicos da ovelha poderá ser efetiva, precisando apenas que seja avaliado seu custo-benefício em rebanhos comerciais para que seja factível de ser adotada pelo produtor. A seleção de indivíduos que permitam a passagem de instrumentos

inseminantes também parece ser viável, porém demanda tempo e recursos. A inclusão dessa característica nos programas de melhoramento animal poderia ser factível principalmente naquelas raças ovinas mais homogêneas e bem trabalhadas geneticamente.

Métodos naturais, mecânicos, farmacológicos ou genéticos devem continuar a serem investigados pelas equipes de pesquisa espalhadas pelo mundo, visto que, viabilizar a técnica de IA transcervical associada ao domínio da tecnologia de congelação de sêmen em ovinos, é condição fundamental para promover um rápido salto genético na espécie e para garantir a preservação do seu germoplasma para as futuras gerações.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPBELL, J.W.; HARVEY, T.G.; McDONALD, M.F. et al. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, v.45, p.1535-1544, 1996.

CROY, B.A.; PRUDENCIO, J.; MINHAS, K. et al. A preliminary study on the usefulness of hull-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. **Theriogenology**, v.52, p.271-287, 1999.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. España: Zaragoza, 1990. 192 p.

GARDE, J.; PÉREZ, S.; GARRIDO, D. et al. Aplicacion del semen congelado de Morueco por via intrauterina dentro del esquema de seleccion de la raza ovina Machega: resultados preliminares. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, 1993, Luso. **Comunicações Livres...Luso: Portugal**, 1993. v. 2, p. 392-398.

GODFREY, R.W.; COLLINS, J.R.; HENSLEY, E.L. et al. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. **Theriogenology**, v.51, p.985-997, 1999.

HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animal**. 7ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. P. 573.

HALBERT, G.W.; DOBSON, H.; WALTON, J.S. et al. The structure of cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v.33, p.977-992, 1990.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

HARVEY, T.H.; JOHNSON, R.L.; BAKER, B.K. et al. Artificial insemination in sheep: comparison of storage time, dose rate and insemination technique. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.46, p. 229-232, 1986.

HUSEIN, M.Q.; BAILEY, M.T.; ABABNEH, J.E. et al. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. **Theriogenology**, v.49, p.997-1005, 1998.

MAXWELL, W.M.C.; HEWITT, L.J. A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. **The Journal of Agricultural Science**, v.106, p.191-193, 1986

MIES FILHO, A.; JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R. et al. Inseminação artificial em ovinos com sêmen congelado e descongelado por dois métodos. **A Hora Veterinária**, ano 8, n. 44, 1988.

MIES FILHO, A.; MOURA, A.; MORAES, J.C.F. et al. Prostaglandina-E em pressários na inseminação artificial (IA) intra-uterina via transcervical em ovinos empregando sêmen congelado. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 10, **Anais...v.2**, p.91, 1993.

NAQVI, S.M.K.; JOSHI, A; BAG, S. et al. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**, v.29, p.329-333, 1998.

NEVES, J. P.; BLAYA, M. C. R.; TEIXEIRA, P. R. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 3, n. 14, p. 11-14, 1983.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

OWINY, J.R.; GILBERT, R.O.; WAHL, C.H. et al. Leukocytic invasion of ovine cervix at parturition. **J. Soc. Gynecol. Invest.**, v.2, n.4, p.593-596, 1995.

SAYRE, B.L.; LEWIS, G.S. Cervical dilatation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewe. **Theriogenology**, v.45, p.1523-1533, 1996.

SAYRE, B.L.; LEWIS, G.S. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. **Theriogenology**, v.48, p.267-275, 1997.

SOUZA, M.I.L. **A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado**. 1993. 47p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

WESTERHAUSEN-LARSON, A.; OWINY, J.R.; NATHANIELSZ, P.W. et al. Type XIV collagen in the pregnant ovine cervix is removed during labor in a leucocyte-mediated process. **J. Soc. Gynecol. Invest.**, v.3, n.2 (Supplement), p.333A, 1996.

WINDSOR, D.P. Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. **Theriogenology**, v.43, p.1009-1018, nov.1995.

WINDSOR, D.P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.21-29, 1997.