

Técnicas de inseminação artificial e implicações fisiopatológicas em ovinos

Caio Tácito Gomes Alvares^{1*}, Jurandir Ferreira da Cruz², Manoel Luiz Ferreira¹

¹Professor da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

²Professor da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA,

*Autor para correspondência, E-mail: caioalvares@uol.com.br

RESUMO. A Inseminação Artificial (IA) em ovinos é uma biotécnica reprodutiva que, combinada a outras biotécnicas, como indução / sincronização de estro e ovulação e tecnologia do sêmen, pode agregar valor à criação, por permitir o uso de reprodutores de elevado padrão genético, utilizar fêmeas fora da estação reprodutiva e padronizar os lotes dos produtos gerados. Este trabalho tem como objetivo apresentar os diversos tipos de IA, baseados no nível tecnológico da técnica e consequente forma de deposição do sêmen: vaginal, cervical ou intrauterina, quer seja via transcervical ou por laparoscopia. São abordados resultados comparativos de concepção, gestação, fertilidade e prolificidade, peculiaridades e influências, como status anatômico cervical de ovelhas, tipos de sêmen e concentrações espermáticas. Destaca-se também algumas implicações fisiopatológicas oriundas de técnicas transcervicais, como reações inflamatórias / infecciosas no trato reprodutivo, ou de técnicas laparoscópicas, a exemplo de regurgitação de conteúdo ruminal e acidose respiratória por pneumoperitônio. Assim, busca-se a compreensão de que, apesar da demanda por avanços científicos nas técnicas de IA, não se pode desconsiderar a necessidade de preservação do bem estar destes animais.

Palavras chave: Biotecnologia, ruminantes

Artificial insemination techniques and physiopathological implications in sheep

ABSTRACT. Artificial Insemination (AI) in sheep is a reproductive biotech that, combined with other biotechnologies such as induction / synchronization of estrus and ovulation and semen technology, can add value to the livestock by allowing the use of sires of high genetic pattern, using females outside the breeding season and standardize lots of products generated. This work aims to present the various types of AI, based on technical and technological level of the consequent form of semen deposition: vaginal, cervical or intrauterine, whether laparoscopic or transcervical route. Comparative results of conception, pregnancy, fertility and prolificacy, traits and influences, such as cervical anatomic status of ewes, types of semen and sperm concentrations are discussed. We also include some physiopathological implications arising from transcervical techniques such as inflammatory / infectious reactions in the reproductive tract, or laparoscopic techniques, like regurgitation of rumen contents and respiratory acidosis by pneumoperitoneum. Thus, we seek the understanding that, despite the demand for scientific advances in AI techniques, one cannot ignore the need to preserve the welfare of these animals.

Keywords: Biotechnology, ruminants

Introdução

A ovinocultura tem adquirido maior importância no cenário nacional, por apresentar características condizentes com o crescente aumento de consumo de carne ovina: ciclo produtivo curto, prolificidade, potencial exploração em áreas pequenas, além de grande

presença na Agricultura Familiar. No entanto, o país ainda não é autossuficiente na produção de carne, sendo constantes as importações deste produto para suprir mercado interno. Tal cenário deve-se em parte a uma estrutura de rebanho ainda pouco organizada, com índices produtivos precários, e pouco acesso ao progresso genético

por parte de rebanhos comerciais. Nesta ótica, uma forma de se aumentar a criação e difusão de animais melhoradores é através de biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial (IA).

A I.A. consiste em se depositar o sêmen do carneiro no trato reprodutivo das ovelhas com auxílio de instrumentos. Aplicada há várias décadas, proporciona benefícios como o melhor aproveitamento dos machos para um maior número de fêmeas através da diluição do sêmen, o uso de animais comprovadamente superiores através de testes de progênie, a variabilidade genética dentro de um rebanho, bem como prevenção de doenças que acometem o trato reprodutivo. Aliada a indução / sincronização de estro e ovulação e tecnologia de sêmen, a IA possibilita estações reprodutivas curtas, inclusive em ovelhas sazonais, tendo como efeito direto a padronização de lotes e agregação de valor aos produtos criados.

Existem diversos tipos de técnicas de IA, de acordo com o nível de dificuldade e local de eleição para deposição de sêmen: vaginal, cervical ou intrauterina, como é o caso das técnicas transcervical e laparoscópica. Desta forma, alguns fatores interferem diretamente nos resultados de concepção, gestação, fertilidade e prolificidade, com destaque para a anatomia tortuosa da cérvix das ovelhas, os diversos protocolos hormonais e tipos de sêmen (fresco, refrigerado ou criopreservado), neste caso, um aspecto peculiar dos ovinos é a baixa resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento – descongelamento, limitando as taxas de prenhez.

Os estudos ao longo destas décadas demonstram que as técnicas que visam deposição do sêmen transcervical e intrauterina ainda apresentam limitações em seus resultados, possivelmente por proporcionarem reações adversas ao transporte espermático, modificações uterinas espermicidas ou embriocidas. Além disso, outras implicações merecem atenção em técnicas transcervicais, como reações inflamatórias e/ou infecciosas oriundas da manipulação da cérvix, ou no caso da laparoscopia, quadros de estresse e acidose respiratória por conta do pneumoperitônio provocado pela insuflação, bem como regurgitação de conteúdo ruminal em função da posição cefalodeclic.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo elucidar sobre as diversas técnicas de IA em ovelhas, destacando suas peculiaridades e

limitações, atentando para suas implicações ao bem estar dos animais.

Inseminação artificial em ovinos

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica da reprodução assistida que consiste na aplicação do sêmen no aparelho reprodutor da fêmea por meio de instrumentos. Visa o melhor aproveitamento de machos previamente selecionados quanto às suas características genéticas e andrológicas, destacando-se a possibilidade de maior número de animais geneticamente melhorados, bem como a variabilidade de genótipos. Em ovinos os primeiros registros desta técnica datam de 1939, ocorrendo um número relativamente elevado de inseminações ao longo das décadas de 1940 e 1950 (Oliveira & Fonseca, 2013). Fisher Neto (2009) sugere algumas vantagens da IA: i) direciona aquisição de reprodutores geneticamente melhoradores, com possibilidade de condomínio entre criadores; ii) diminui necessidade de maior número de machos para realização da mesma estação reprodutiva; iii) proporciona agregação genética em maior número de fêmeas comparada a monta natural; iv) viabiliza testes de progênie; v) previne transmissão de doenças venéreas; vi) padronização e valorização dos cordeiros.

A utilização da IA pode ser com sêmen fresco, resfriado ou congelado. Nos dois primeiros casos, a possibilidade de popularização da técnica é maior, por demandarem instrumentos menos onerosos para deposição no trato genital feminino, enquanto que no caso do sêmen congelado é possível alcançar melhores resultados em termos de progresso genético do rebanho. Portanto, a escolha da modalidade da técnica está dependente de sua adequação ao nível tecnológico do rebanho e infraestrutura (Bicudo et al., 2005).

Basicamente, a técnica consiste tanto na coleta e preparo da dose de sêmen quanto na aplicação da mesma no trato genital da ovelha em um momento ótimo de estro e ovulação. Dessa forma, existem diversas combinações metodológicas que influenciam diretamente os resultados, bem como o retorno econômico: tipos de sêmen (fresco, refrigerado ou criopreservado), estro natural, induzido ou sincronizado (a depender da influência da estacionalidade reprodutiva). Ainda, algumas práticas de manejo reprodutivo também podem proporcionar

incrementos no resultado, como, por exemplo, a utilização do efeito macho e *flushing* alimentar.

Diferentemente de outras espécies domésticas, em que a IA com sêmen congelado é praticada amplamente com relativo sucesso, como em bovinos, na espécie ovina existem entraves anatômico fisiológicos que limitam a popularização da IA: a cérvix da ovelha é longa, tubular e fibrosa, altamente tortuosa, com quatro a sete anéis desalinhados, que promovem uma barreira física contra contaminações externas (Kershaw et al., 2005), de modo que, mesmo em condição de estro, torna-se difícil a transposição desta estrutura, limitando a deposição intrauterina do sêmen; por outro lado, o espermatozóide ovino é mais susceptível a injúrias no processo de criopreservação, devido a maior sensibilidade de sua membrana à congelação, tendo consequências na atividade respiratória, criocapacitação e interação com células da tuba uterina, diminuindo sua capacidade fecundante (Bicudo et al., 2005). Diante desta realidade, foram estudadas e desenvolvidas diversas técnicas de IA em diferentes graus de dificuldade, como demonstrado a seguir.

Diferentes técnicas e instrumentos de Inseminação artificial em ovinos

À medida que se busca aprofundamento da deposição da dose de sêmen, o nível de tecnificação e grau de dificuldade da IA aumenta, envolvendo aspectos como tipo e quantidade do rebanho, tecnologia do sêmen a ser utilizado, buscando as melhores taxas de fertilidade. Sendo assim, as técnicas de IA em ovinos podem ser caracterizadas como: vaginal, cervical e intrauterina, esta última podendo ser por via transcervical ou laparoscopia.

Vaginal

Trata-se da técnica mais simples, em que se realiza a deposição do sêmen na vagina da ovelha o mais profundo possível, “às cegas”, pelo fato de não necessariamente se observar o sítio de deposição da dose, nem se ter a intenção de localizar e transpassar a cérvix. Utiliza-se, portanto, somente sêmen fresco ou resfriado com elevada concentração espermática, entre 200 e 400 milhões de espermatozoides (sptz) por dose, de forma que são relatadas taxas de prenhez entre 40 e 65%. A vantagem consiste em não se necessitar manipulação prolongada da ovelha, que permanece em posição quadrupedal ou bipedal anterior ao momento da IA, com

higienização da vulva. Como instrumentos, são utilizados espéculo vaginal e pipeta ou seringa dosadora de inseminação, podendo alcançar penetração de até 13 cm, comprimento da vagina (Ferra & Sereno, 2006, Oliveira & Fonseca, 2013).

Dados obtidos de 44.448 inseminações em rebanhos ovinos da raça Churra na Europa demonstraram taxa de prenhez média de 31,25% com sêmen resfriado (400 milhões sptz/dose 0,25mL), comparada à laparoscopia com sêmen congelado, 44,89% (Anel et al., 2005). Um experimento realizado na Noruega por Paulenz et al. (2007), contudo, demonstra a utilização de IA com sêmen congelado via vaginal e sem uso de espéculo, ao estro natural: os autores compararam os modelos alemão e francês de palhetas de 0,25mL e diferentes métodos de descongelamento do sêmen, observando taxas médias de não retorno de estro entre os grupos estudados de 61,8% e fertilidade de 59,1%, sem diferença entre os tratamentos.

Cervical

Esta técnica visa à deposição do sêmen no interior da cérvix em diferentes graus de profundidade: superficial, média ou profunda, de acordo com a quantidade de anéis cervicais transpassados, portanto, é diretamente influenciada por fatores como momento do estro, idade, ordem de parição (Windsor, 1995). É uma técnica bem difundida por ser rápida e relativamente fácil, de pouca manipulação; preconiza-se a posição bipedal anterior para esta técnica, com a possibilidade de uso de cavalete, ou mesmo o uso da posição quadrupedal (Oliveira & Fonseca, 2013). Pode ser combinada com uso de sêmen fresco e estro natural ou sincronizada. Na região sul, rebanhos de ovelhas sincronizadas com prostaglandina (duas doses entre sete dias) apresentaram taxas de concepção entre 50% e 68% (Fischer Neto, 2009). Uma forte limitação do uso de sêmen congelado com esta técnica foi demonstrada por Cardoso et al. (2009) ao se comparar IATF cervical com sêmen fresco *versus* congelado em fêmeas Santa Inês sincronizadas, os autores alcançaram taxas de prenhez de 58,8% *versus* 14,7% respectivamente, tornando inviável economicamente o uso de sêmen congelado. Da mesma forma, Sánchez-Partida et al. (1999) haviam demonstrado tal limitação desta combinação IA cervical e sêmen congelado, com taxas de prenhez aos 65 dias entre 11% e 20%.

Devido à limitação anatômica que a cérvix proporciona ao progresso da técnica de IA, muitos pesquisadores investigaram a associação de determinados fármacos visando a dilatação cervical ao momento da inseminação, como demonstrado no estudo de Horta et al. (2010) que realizaram em ovelhas Serra da Estrela administração vaginal de misoprostol com sulfato de terbutalina seis horas antes da IATF com sêmen resfriado; a proporção de IA cervical não apresentou diferença significativa comparada ao grupo controle (37,8% vs. 45,2%), embora se tenha observado maior taxa de prenhez (70,6% vs. 57,9%), o que levou os autores a especularem que estes fármacos proporcionaram mudanças na secreção local que permitiram a cérvix reter mais espermatozóides viáveis para fertilização.

Gündüz et al. (2010) investigaram o efeito do carazolol, um agente bloqueador beta-adrenérgico, com a hipótese de que o aumento de tônus cervical permitiria maior profundidade de penetração da pipeta e melhor fluxo de espermatozóides após IA.

Ovelhas Kivircik foram submetidas à administração intramuscular de carazolol 30 minutos antes da IA cervical; o carazolol não permitiu a penetração completa em nenhuma ovelha, a taxa de penetração cervical profunda (maior que 20 mm) foi maior comparada com ovelhas não tratadas, 48% vs. 33%, respectivamente, embora a proporção de profundidade maior do que rasa (a partir de 10 mm) tenha sido similar entre os dois grupos (85% vs. 82%), bem como a taxa de prenhez (63% vs. 56%), concluindo que o carazolol não contribuiu para incremento da produção de cordeiros. Da mesma forma, King et al. (2004) não obtiveram sucesso com o uso da ocitocina em ovelhas submetidas à IA cervical com sêmen criopreservado, não observando nenhuma penetração cervical completa, além disso, houve efeito negativo da ocitocina na taxa de prenhez (42% vs. 10%); Saire e Lewis (1997) haviam relatado que a ocitocina não necessariamente compromete o transporte espermático, atribuindo à manipulação da cérvix os piores resultados de taxa de prenhez: após observarem 0% de prenhez em ovelhas submetidas à IA cervical com administração prévia de ocitocina, os autores realizaram outro experimento em arranjo fatorial 2x2, i.e., IA por laparoscopia ou cervical e administração de ocitocina ou solução salina, com isso, observou-se taxa de fertilização do *ovum* semelhante entre IA cervical com ocitocina

ou solução salina (26,7% vs. 29,2%, respectivamente), sendo os resultados com laparoscopia superiores em ambas as administrações (100% e 82,4%, respectivamente).

Transcervical

Diante de resultados pouco expressivos de IA cervical ou vaginal como sêmen criopreservado, surgiram estudos que buscassem a deposição intrauterina do sêmen transpassando a cérvix, caracterizando, portanto, a técnica de IA transcervical. Para tanto, fez-se necessário aprender e conhecer sobre o principal obstáculo: a *anatomia cervical*.

Fukui & Roberts (1978) relatam que os primeiros estudos para viabilização desta técnica ocorreram ainda na década de 1970, utilizando diversas ferramentas de mensuração anatômica da cérvix, como, por exemplo, gás carbônico e corantes. Posteriormente, uma metodologia foi proposta por Halbert et al. (1990a) no Canadá, visando a aplicação comercial em larga escala. Comparando diferentes instrumentos e contenções, os autores identificaram como mais eficiente a combinação de decúbito dorsal com quarto posterior elevado, uso de espéculo “bico de pato” para se encontrar o óstio cervical, e pinças para fixá-lo, com penetração do instrumento de IA através do canal. Dessa forma, foram alcançados 82% de penetração uterina, e esta técnica passou a ser denominada “Sistema Guelph de Inseminação Artificial Transcervical” (*Guelph System for Transcervical Artificial Insemination – GST-AI*). Este mesmo grupo de pesquisa do Canadá divulgou seus estudos em IA transcervical aplicados em campo, mensurando local de deposição do sêmen e taxa de prenhez em diferentes grupos de ovelhas, demonstrando que, quanto mais profunda a penetração da pipeta, maior a possibilidade de concepção (Halbert et al., 1990b), como demonstrado na Tabela 1.

Estudos demonstram também a adequação de instrumentos de IA para se melhorar seu desempenho. Aral et al. (2010) construíram um modelo denominado “Air Pump”: uma pipeta de IA bovina com um revestimento externo de aço inoxidável, acoplado a uma bomba de ar à extremidade arredondada da pipeta por meio de um tubo de borracha com diâmetro interno de 2,6 mm (Figura 1). Com 0,1 mL de sêmen fresco na pipeta, uma vez alcançando o óstio cervical com auxílio de espéculo e luz, a bomba de ar foi

ligada, pressionando o sêmen ao canal cervical. Comparando-se com a IA cervical convencional, os resultados de prenhez e fertilidade foram superiores: 80,0% vs. 46,7% e 70% vs. 47%, respectivamente. Diante dos resultados com sêmen fresco (300 milhões spz/mL), os autores defenderam a proposta de se estudar esta técnica com sêmen criopreservado.

Alguns fatores influenciam diretamente o sucesso do *GST-AI*: estudos relatam melhor eficiência de penetração cervical a partir de maior número de repetições da técnica, bem como o período de serviço da ovelha, sendo melhores resultados ocorridos em ovelhas com último parto ocorrido em período inferior a quatro meses para ovelhas sazonais, com consequência na taxa

de prenhez (Buckrell et al., 1994) como sugere a Tabela 2.

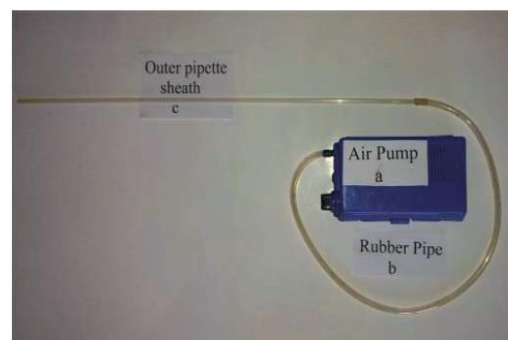


Figura 1. Equipamento de IA "Air Pump": a) bomba de ar ("air pump"), b) tubo de borracha, c) pipeta com revestimento externo de aço inoxidável usada em bovinos. Adaptado de Aral et al. (2010).

Tabela 1. Porcentagem de partos de ovelhas por local de deposição do sêmen utilizando técnica transcervical. Adaptado de Halbert et al. (1990b)

Penetração da pipeta	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	IA (n)	Parto (%)	IA (n)	Parto (%)	IA (n)	Parto (%)
Uterina	2	100	18	83	29	59
Cervical profunda	4	75	13	39	3	0
Cervical média	6	17	9	22	6	0
Total	12	50	40	55	38	45

Grupo I: sêmen fresco, 400 milhões spz, ovelhas Suffolk; Grupo II: sêmen criopreservado, 150 milhões spz, ovelhas Suffolk; Grupo III: sêmen criopreservado, 150 milhões spz, ovelhas cruzadas "cara branca".

Windsor (1995) ressaltou peculiaridades na raça Merino australiana utilizando o *GST-AI*, na qual não se observou influência do período pós-parto entre 12 e 26 semanas na taxa de penetração cervical, mas detectou diferença significativa quanto ao número de partos por ovelha, ou seja, quanto maior, aumenta-se também a taxa de penetração cervical; além disso, foi observado elevado grau de repetibilidade individual, isto é, em ovelhas submetidas a três tentativas de penetração cervical predomina-se ou todas ou nenhuma das passagens bem sucedidas. O uso do *GST-AI* com sêmen congelado em ovelhas Ramboliet e

Ramboliet x Boroolla sincronizadas proporcionou uma taxa de prenhez de 20,7%, inferior à laparoscopia, 43,9% (McKusick et al., 1998). Influências da raça, sêmen e inseminador também foram detectadas por Donovan et al. (2004) utilizando sêmen fresco ou criopreservado ao estro natural ou sincronizado (Tabela 3). Esta influência, aliada à idade das ovelhas, foi corroborada por Kaabi et al. (2006), que avaliaram o uso *postmortem* de dois tipos de cateter na penetração cervical de ovelhas de cinco raças diferentes, observando melhores resultados nas ovelhas mais velhas das raças Merino e Castellana.

Tabela 2. Sucesso da penetração cervical em função do período de serviço da ovelha e experiência do inseminador. Adaptado de Buckrell et al. (1994).

Mensuração	Nº de ovelhas	Taxa de penetração (%)
Período de serviço < 4 meses	1106	92,3a
Período de serviço > 4 meses	894	82,4b
500 tentativas iniciais	500	76,3c
500 tentativas posteriores	500	97,9d
Nº total de ovelhas manipuladas	2060	87,8

a > b P=0.06; c < d P=0.01

Tabela 3. Efeito da raça e inseminador na taxa de prenhez de ovelhas após IA cervical com sêmen fresco ou criopreservado. Adaptado de Donovan et al. (2004).

Variáveis	Sêmen fresco		Sêmen criopreservado	
	Nº ovelhas	Prenhez (%)	Nº ovelhas	Prenhez (%)
Raça				
Finn	8	87	52	52
Hillcross	23	78	81	47
Lowland cross	27	70	106	79
Inseminador				
Irlandês	29	66	117	36
Norueguês	29	86	122	45

Raça $p < 0,01$; inseminador $p < 0,05$

Adaptações à técnica GST-AI foram experimentadas por Naqvi et al. (1998) em ovelhas da raça Malpura, em que se utilizou uma agulha espinhal com uma extremidade em forma de parafuso, modificada para caber na pipeta de IA. A taxa de penetração cervical ao estro natural foi de 14,8% para não penetração (deposição do sêmen no óstio cervical), 40,4% cervical mediana e 44,7% uterina, com respectivas taxas de prenhez utilizando sêmen criopreservado (500 milhões spz/dose de 0,5mL) de 0%, 28,5% e 27,2%. Wulster-Radcliffe & Lewis (2002) desenvolveram um instrumento para manipular a cérvix de forma atraumática (Figura 2), realizando comparação entre tratamentos: I) IA transcervical (IATC) intrauterina usando o novo cateter + falsa IA via laparotomia; II) falsa IATC + IA intrauterina via laparotomia usando instrumento laparoscópico; III) falsa IATC + IA intrauterina via laparotomia usando o novo cateter; após 72 horas, os úteros foram coletados *postmortem* para recuperação de oócitos e embriões.

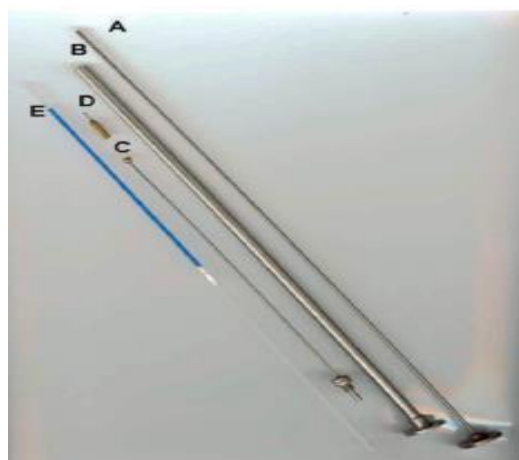


Figura 2. Equipamento de inseminação artificial transcervical: A) êmbolo para pipeta; B) pipeta; C) aplicador transcervical; D) agulha para IA laparoscopia; E) pallet de sêmen de 1 cm³. Adaptado de Wulster-Radcliffe et al. (2004).

Os tratamentos não afetaram significativamente a taxa de recuperação de *ovum* e embriões (média 87,3%), taxa de fertilização (59,3%), nem taxa de prenhez ao 3º dia pós IA (66,6%), de modo que os autores consideraram não prejudicial à utilização do instrumento proposto. Entretanto, um estudo posterior com os mesmos instrumentos demonstraram taxas de prenhez aos 30 e 50 dias bem inferiores comparadas a laparoscopia, 5,0% vs. 46,0% e 4,0% vs. 41,0%, respectivamente (Wulster-Radcliffe et al., 2004).

De Rossi et al. (2009) utilizaram métodos de dilatação cervical visando facilitar o acesso ao útero via transcervical, para tanto, experimentaram anestesia subaracnóide com ketamina (KS) e administração local de misoprostol com ocitocina endovenosa (MO), gerando os tratamentos KS, MO e KSMO. Foi constatada dilatação cervical e fácil passagem do instrumento em todos os tratamentos entre 15 e 30 minutos após as administrações dos fármacos; observou-se ataxia e decúbito esternal por 25 minutos em KS e KSMO, além dos efeitos sistêmicos (frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura retal) não se alterarem, bem como não ocorreram sinais de desconforto, entretanto, em MO, os sinais de dor foram evidentes, com vocalização, chutes e reações. A utilização do KS, portanto, foi favorável à técnica transcervical, com retração caudal da cérvix com pinça Allis e transfixação com pinças Pozzy (Figura 3), porém, sem conhecimento das consequências nos aspectos reprodutivos. Leethondee et al. (2007) utilizaram administração intracervical de misoprostol, FSH ou ambos em ovelhas Welsh Mountain durante o período peri-ovulatório e puderam observar uma antecipação da dilatação cervical máxima de 72h em condições naturais para 54h, momento ótimo para realização da IATF.



Figura 3. Aplicador expansor para IA transcervical. Retração e transfixação cervical com pinças Allis. Fazenda Almada, UESC, BA.

Laparoscopia

Em ovelhas, a proposta mais desejável de inseminação consiste na deposição intrauterina de sêmen criopreservado, sendo possível assim o uso de menor quantidade de sêmen ou mesmo uma menor concentração espermática. Dessa forma, as primeiras tentativas de inseminação artificial em ovelhas com este intuito ocorreram via cirúrgica, por laparotomia, ao longo das décadas de 60 e 70, quando se observou, contudo, que tal técnica proporcionava elevada fertilização, porém baixa taxa de nascimento, principalmente por morte embrionária, independente de ser com sêmen fresco ou criopreservado (Mattner et al., 1969, Killeen & Moore, 1970), além da potencial formação de adesão tecidual pós-operatória (Amiridis & Cseh, 2012). McKelvey et al. (1985) citam experiências prévias do uso de laparoscopia em suínos, além do pioneirismo em ovelhas na Austrália em 1982, com os pesquisadores Killeen & Moore (1970) da Universidade de Sidney.

Oliveira & Fonseca, (2013) descrevem a técnica da seguinte forma: as ovelhas devem ser submetidas a um jejum sólido e hídrico por 24 horas; a contenção da fêmea é em decúbito dorsal em maca, com inclinação de 45° a 60° céfalo-declive, isto é, posição de Trendelenburg; realiza-se tricotomia e antisepsia da região abdominal cranial ao úbere, duas pequenas incisões são realizadas aos locais dos botões anestésicos previamente feitos (uso de lidocaína 2% em torno de 10 cm cranialmente a cada teto), o primeiro trocar com cânula é introduzido, seguindo-se de insuflação do abdome com CO₂, no segundo ponto, introduz-se outro trocar com sua cânula, o endoscópio é inserido através da cânula de insuflação e a pipeta de inseminação através da segunda cânula. A deposição do sêmen

é feita diretamente nos cornos uterinos, porção mediodistal, após isso, os instrumentos são retirados e procede-se a desinsuflação, sendo dispensada a sutura das incisões para o caso de tracteres de 5mm, apenas curativo local (Figura 4). Relatos iniciais abordam anestesia geral com tiopental EV e halotano após intubação (McKelvey et al., 1985). Atualmente, a sedação a base de xilasina torna-se interessante para, juntamente com o jejum, minimizar o risco de regurgitação.

Embora mais eficiente, trata-se de uma técnica nitidamente mais complexa, onerosa por demandar mão de obra especializada (Cardoso et al., 2009). Por isso, sua viabilidade econômica é alcançada quando se trata de uso em rebanhos de genética superior, combinada a outras biotécnicas reprodutivas, como fertilização e produção *in vitro* de embriões (FIV, PIV), bem como múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) (Forcada et al., 2012).

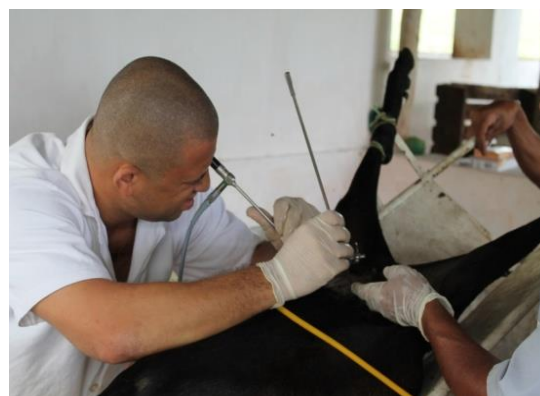


Figura 4. Realização de IA por laparoscopia, Fazenda Almada, UESC, BA.

Em uma das primeiras pesquisas da laparoscopia comparada à inseminação cervical, McKelvey et al. (1985) utilizaram ovelhas sincronizadas e sêmen fresco com 600 X 10⁶ (dose única) ou 960 X 10⁶ (duas doses) sptz na IA cervical e 48 X 10⁶ sptz na laparoscopia, obtendo resultados semelhantes para fertilidade (67% vs. 75%) e prolificidade (2,21 vs. 1,97), respectivamente. Milczewski et al. (2000) avaliaram o uso do sêmen resfriado com deposição intrauterina ou cervical, com diluentes citrato-gema ou CUE (*Cornell University Extender*) obtendo resultados de prenhez superiores pela via laparoscópica, 77,27%, comparada a 14,89% pela via cervical. Diluidores a base de água de coco também foram testados no Nordeste do Brasil para IA com sêmen resfriado, proporcionando taxas de prenhez de 35,7% vs. 71,8% para intra-cervical e laparoscópica,

respectivamente (Machado et al., 2006). Esta superioridade nos resultados desta técnica se justifica pela possibilidade de deposição do sêmen próximo ao sitio de fecundação. Esta vantagem é bem nítida nos relatos de Fair et al. (2005) que demonstraram a influência da raça ovina na taxas de fertilização e qualidade do embrião: ao serem comparadas as técnicas cervical e laparoscópica em ovelhas Belclare e Suffolk, os autores observaram diferenças significativas na proporção de oócitos fertilizados após IA por laparoscopia vs. cervical (54% vs. 19%), mais oócitos fertilizados por ovelhas Belclare do que Suffolk após IA cervical (34% vs. 10%), e produção semelhante entre as raças quando usada laparoscopia (62% vs. 60%, respectivamente). No entanto, um estudo realizado por Rabassa et al. (2007) com sêmen criopreservado não apresentou diferença nas taxas de prenhez entre as técnicas transcervical e laparoscópica, 40% para ambas, embora se tenha utilizado ovelhas Corriedale em anestro estacional.

Segundo Emsen et al. (2008), alguns fatores afetam diretamente o desempenho reprodutivo das ovelhas inseminadas via laparoscópica, como o uso de duas doses de sêmen (intervalo médio de sete horas) e avaliação do sêmen pós-descongelamento; estes fatores, aliados ao uso de ovelhas submetidas a diferentes programas reprodutivos, influenciaram a razão macho:fêmea nos nascimentos.

Implicações fisiopatológicas

Nas técnicas de IA em ovinos, além da influência direta do manejo, raça, habilidade do

inseminador e *status* fisiológico das ovelhas (Donovan et al., 2004, Emsen et al., 2008), outros fatores limitam os resultados de prenhez, como a anatomia cervical e o tipo de sêmen, já mencionados anteriormente. Ainda, como consequências deletérias ao animal, destacam-se as reações inflamatórias e/ou infecciosas a partir da manipulação do trato reprodutivo e quadros de pneumoperitônio oriundos da utilização da insuflação abdominal na técnica de laparoscopia.

Relatos sobre perfuração da cérvice e deposição de sêmen na cavidade abdominal são presentes em pesquisas sobre IA transcervical Halbert et al. (1990b); da mesma forma, casos de abscessos pericervicais e piometra são evidentes (McKelvey, 1994).

Em um estudo criterioso sobre IA cervical, Campbell et al. (1996) avaliaram as consequências anatômicas e histológicas no trato reprodutivo de ovelhas Romney sincronizadas: uma vez que os inseminadores realizaram a penetração cervical, as ovelhas foram submetidas à eutanásia com a pipeta no local de máxima penetração cervical, sendo possível mensurar o grau de penetração cervical e os danos teciduais locais, estes tecidos também foram avaliados histologicamente. Os autores observaram 31,6% de penetração fora do trato reprodutivo, 31,6% no útero e 36,8% na cérvice. Histologicamente, o escore de dano tecidual foi mensurado como 1 – sem dano, 2 – danos epiteliais menores, 3 – danos epiteliais maiores, 4 – danos subepiteliais e 5 – perfuração na camada subepitelial, predominando escores entre 2 e 3, como observado na Tabela 4.

Tabela 4. Escore de dano tecidual na cérvice baseado na penetração da pipeta ou na secção cervical. Adaptado de Campbell et al. (1996).

Dano tecidual* (p<0,01)	Quanto à penetração da pipeta			
	Cérvice	Útero	Fora do trato	Erro padrão
	2.48 a	2.61 a	1.78 b	.20
Dano tecidual* (p<0,001)	Quanto à secção da cérvice			
	Vaginal	Mediana	Uterina	Erro padrão
	2.73 a	2.42 a	1.72 b	.20

*Escore de dano tecidual: 1 – sem dano, 2 – danos epiteliais menores, 3 – danos epiteliais maiores, 4 – danos subepiteliais e 5 – perfuração na camada subepitelial.

Em um ensaio com ovelhas Santa Inês submetidas à IATF transcervical com sêmen congelado, apesar de 98% de taxa de deposição intrauterina, a taxa de não retorno ao estro foi de 37,5% e não houve prenhez, sugerindo possíveis deposições de sêmen fora do trato reprodutivo

(Alvares et al., 2013). Reações inflamatórias locais podem ocorrer a partir do aporte sanguíneo consequente aos danos da penetração cervical (Figura 5) com influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Shirasuna et al., 2012), da mesma forma, a dificuldade de penetração

cervical está associada ao prejuízo no transporte espermático, pois o estresse provocado por essa manipulação pode induzir liberação dos compostos espermicidas (Hawk, 1983, Leethongdee, 2010).

Na IA por laparoscopia, as implicações são relacionadas ao estresse causado pela intervenção cirúrgica, com destaque para o pneumoperitônio ocasionado pela insuflação de CO₂ ou Ar e o uso da posição céfalo-declive de Trendelemburg.

Martin et al. (1981) atentaram para possível influência da laparoscopia no surgimento da onda de LH e ovulação de ovelhas sazonais após introdução de carneiros: o número de ovelhas que apresentaram onda de LH e ovulação foi menor (1/20) quando submetidas a sucessivas laparoscopias (a cada quatro horas) para monitoramento da ovulação e mais elevado nível de cortisol, comparando-se a ovelhas em que somente se coletou sangue para dosagem hormonal (10/23).



Figura 5. Hematoma no terço medial da cérvix de ovelha submetida à manipulação da IA transcervical e abatida 24 horas depois. Fazenda Almada, UESC, BA.

A realização da IA por laparoscopia requer utilização de pneumoperitônio, através da insuflação com gás para se melhorar o campo de visão na cavidade peritoneal. O dióxido de carbono (CO₂) é normalmente eleito como o gás a ser usado na insuflação, por ser transparente, não comburente e solúvel em água, o que reduz o risco de embolia gasosa (Lemos et al., 2003); no entanto, provoca-se aumento da pressão intra-abdominal (PIA) e hipercapnia, com consequente elevação da pressão arterial de CO₂ (PaCO₂) e acidose respiratória pela absorção peritoneal, além de poder desencadear ativação adreno-simpática, portanto, PIA e PaCO₂ elevadas podem proporcionar quadro de estresse durante a laparoscopia (Ishizuka et al., 2000). Curet et al.

(1996) demonstraram, realizando cirurgia experimental em ovelhas gestantes, que o pneumoperitônio com CO₂ na laparoscopia causa aumento da pressão intrauterina, diminuição do fluxo sanguíneo uterino, além de acidose materna e fetal. Lemos et al. (2003) estudaram uma alternativa para substituição do CO₂ com o uso de Ar ambiente que, apesar de maior risco de embolia gasosa e bacteremia, proporciona menor alteração no equilíbrio acidobásico. Estes autores demonstraram viabilidade do uso do Ar comparado ao CO₂, por não alterar a PaCO₂.

A posição de Trendelemburg, com céfalo-declive pode implicar em aspiração do conteúdo de regurgitação ruminal (Figura 6).



Figura 6. Regurgitação do conteúdo ruminal de ovelha submetida à laparoscopia em posição céfalo-declive de Trendelemburg. Fazenda Almada, UESC, BA.

Feranti et al. (2013) propuseram inseminação com posicionamento quadrupedal e uso de agulha espinhal, observando muitas dificuldades, tais como descolamento de peritônio após insuflação, perfuração do diafragma e pneumotórax, além do longo tempo de execução, entre 17 e 22 minutos.

Considerações finais

Uma vez que a demanda pelo uso de biotécnicas reprodutivas em ovinos avança consideravelmente, diversas pesquisas evidenciam alternativas que visem o incremento dos resultados em termos de concepção, manutenção da gestação, fertilidade ao parto e prolificidade, superando os entraves anátomo-fisiológicos peculiares da espécie ovina. Entretanto, há de se considerar que esta busca por melhores resultados ainda proporciona diferentes “custos”, tanto financeiros, traduzidos em necessidades de utilização de protocolos hormonais, equipamentos cirúrgicos e mão de obra qualificada, quanto éticos, onde ovelhas

doadoras são submetidas a consecutivos programas de multiplicação de genética superior (sincronização de estro, superovulação, MOTE), que acarretam consequências fisiopatológicas ao organismo, diminuindo inclusive sua vida útil. Assim, considerando as técnicas atuais de IA, a relação benefício / custo se restringe aos rebanhos elite ou, no máximo, multiplicadores, estando ainda longe de alcançar a popularização e viabilização destas técnicas em rebanhos comerciais, a exemplo da bovinocultura, de modo que permanece o desafio de se identificar uma proposta de IA que ao mesmo tempo seja eficiente, acessível e não comprometa o bem-estar dos animais.

Referências bibliográficas

- Alvares, C. T. G.; Cruz J. F., Del Rei, A. J. M. & Bartolomeu, C.C. Inseminação artificial transcervical com sêmen congelado em ovelhas Santa Inês ao estro natural ou sincronizado. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte, CBRA, 2013 (CD-ROM) p.16.
- Amiridis, G. S. & Cseh, S. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 152-161.
- Anel, L.; Kaabi, M.; Abroug, B.; Alvarez, M.; Anel, E.; Boixo, J. C.; De la Fuente, L. F. & De Paz, P. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, 63, 1235-1247.
- Aral, F.; Yavuzer, U. & Zonturlu, A. K. 2010. The effect of air pressure with cervical artificial insemination on the fertility of Awassi ewes synchronized with PGF2 α . *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 37-41.
- Bicudo, S.; Azevedo, H.; Silva Maia, M.; Sousa, D. & Rodello, L. 2005. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Science Veterinária*, 33, 127-130.
- Buckrell, B. C.; Buschbeck, C.; Gartley, C. J.; Kroetsch, T.; McCutcheon, W.; Martin, J.; Penner, W. K. & Walton, J. S. 1994. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42, 601-611.
- Campbell, J. W.; Harvey, T. G.; McDonald, M. F. & Sparksman, R. I. 1996. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, 45, 1535-1544.
- Cardoso, E.; Cruz, J. F.; Ferraz, R. d. C. N.; Teixeira Neto, M. R. & Santos, R. S. 2009. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 4, 217-222.
- Curet, M. J.; Vogt, D. A.; Schob, O.; Qualls, C.; Izquierdo, L. A. & Zucker, K. A. 1996. Effects of CO₂ pneumoperitoneum in pregnant ewes. *Journal of Surgical Research*, 63, 339-344.
- De Rossi, R.; Carneiro, R. P.; Ossuna, M. R.; Zanenga, N. F.; Alves, O. D.; Jorge, T. P.; Costa e Silva, E. V. & Vasconcelos, J. 2009. Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. *Small Ruminant Research*, 83, 74-78.
- Donovan, A.; Hanrahan, J. P.; Kummén, E.; Duffy, P. & Boland, M. P. 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, 84, 359-368.
- Emsen, E.; Gimenez Diaz, C. A.; Yaprak, M.; Koycegiz, F.; Kutluca, M. & Aslan, F. A. 2008. Factors affecting the reproductive performance of fat-tailed ewes inseminated with laparoscopy in the late breeding season. *Animal Reproduction*, 5, 30-33.
- Fair, S.; Hanrahan, J. P.; O'Meara, C. M.; Duffy, P.; Rizos, D.; Wade, M.; Donovan, A.; Boland, M. P.; Lonergan, P. & Evans, A. C. O. 2005. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, 63, 1995-2005.
- Feranti, J. P.; Brun, M. V.; Zanella, E.; Messina, S. A.; Schuh, R.; Santos, F. R. & Brambatti, G. 2013. Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 687-693.

- Ferra, J. C. & Sereno, J. R. B. 2006. Inseminação artificial em ovinos. *Embrapa Cerrados. Documentos*, 26.
- Fisher Neto, A. 2009. Aplicação comercial das biotécnicas reprodutivas em ovinos. *Revista Brasileira de Reproducao Animal*, 6, 182-186.
- Forcada, F.; Sánchez-Prieto, L.; Casao, A.; Palacín, I.; Cebrián-Pérez, J. A.; Muiño-Blanco, T. & Abecia, J. A. 2012. Use of laparoscopic intrauterine insemination associated with a simplified superovulation treatment for in vivo embryo production in sheep: a preliminary report. *Animal Production Science*, 52, 1111-1116.
- Fukui, Y. & Roberts, E. M. 1978. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*, 10, 381-393.
- Gündüz, M. C.; Turna, Ö.; Cirit, Ü.; Uçmak, M.; Tek, Ç.; Sabuncu, A. & Bacinoğlu, S. 2010. Lambing rates and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. *Animal Reproduction Science*, 118, 32-36.
- Halbert, G.; Dobson, H.; Walton, J. & Buckrell, B. 1990a. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33, 993-1010.
- Halbert, G.; Dobson, H.; Walton, J.; Sharpe, P. & Buckrell, B. 1990b. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33, 1231-1243.
- Hawk, H. W. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science*, 66, 2645-2660.
- Horta, A.; Barbas, J.; Marques, C.; Baptista, M.; Vasques, M.; Pereira, R.; Mascarenhas, R. & Cavaco-Gonçalves, S. 2010. Improvement of fertility in artificially inseminated ewes following vaginal treatment with misoprostol plus terbutaline sulphate. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, e412-e416.
- Ishizuka, B.; Kuribayashi, Y.; Kobayashi, Y.; Hamada, N.; Abe, Y.; Amemiya, A.; Aoki, T. & Satoh, T. 2000. Stress responses during laparoscopy with CO₂ insufflation and with mechanical elevation of the abdominal wall. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 7, 363-371.
- Kershaw, C. M.; Khalid, M.; McGowan, M. R.; Ingram, K.; Leethongdee, S.; Wax, G. & Scaramuzzi, R. J. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64, 1225-1235.
- Killeen, I. D. & Moore, N. W. 1970. Fertilization and survival of fertilized eggs in the ewe following surgical insemination at various times after the onset of oestrus. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23, 1279-1288.
- King, M.; McKelvey, W.; Dingwall, W.; Matthews, K.; Gebbie, F.; Mylne, M.; Stewart, E. & Robinson, J. 2004. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*, 62, 1236-1244.
- Leethongdee, S. 2010. Development of transcervical artificial insemination in sheep with special reference to anatomy of cervix. *Suranaree Journal Science Technology*, 17, 57-69.
- Lemos, S.; Vinha, J.; Silva, I.; Novaes, P.; Oliveira, M.; Paula, G.; Rebelo, C. & Marinho, M. 2003. Efeitos do pneumoperitônio com ar e CO em suínos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 18.
- Machado, V. P.; Nunes, J. F.; de ARAÚJO, A. A.; Fernández, D. R. P.; Cordeiro, M. A.; Medeiros, C. H. N.; Medeiros, A. L. N. & Monteiro, A. W. U. 2006. Fertilidade após a inseminação artificial intra-cervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43, 43-49.
- Martin, G.; Oldham, C. & Lindsay, D. 1981. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. *Theriogenology*, 16, 39-44.
- Mattner, P.; Entwistle, K. & Martin, I. 1969. Passage, survival, and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22, 181-188.
- McKelvey, W. 1994. Recent research on AI and MOET in sheep and their commercial

- application in the UK. *Proceeding NZ Embryo Transfer Workshop*.
- McKelvey, W.; Robinson, J.; Aitken, R. & Henderson, G. 1985. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24, 519-535.
- McKusick, B.; Thomas, D.; Gottfredson, R.; Zelinsky, R. & Berger, Y. 1998. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. *Proceedings 46th annual spooner sheep day*, 32-39.
- Milczewski, V.; Kozicki, L.; Luz, S. & Neves, J. 2000. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Archives of Veterinary Science*, 5.
- Naqvi, S.; Joshi, A.; Bag, S.; Pareek, S. & Mittal, J. 1998. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. *Small Ruminant Research*, 29, 329-333.
- Oliveira, M.E.F. & Fonseca, J.F. Inseminação artificial. In: Oliveira, M.E.F., Teixeira, P.P.M., Vicente, W.R.R. *Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos*. 1ª Ed., São Paulo, Editora Med Vet, 2013. 305p
- Paulenz, H.; Adnoy, T. & Soderquist, L. 2007. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49, 26-32.
- Rabassa, V. R.; Tabeleão, V. C.; Pfeifer, L. F. M.; Schneider, A.; Ziguer, E. A.; Schossler, E.; Severo, N. C.; del Pino, F. A. B. & Corrêa, M. N. 2007. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixado. *Ciência Animal Brasileira*, 8, 127-134.
- Sánchez-Partida, I. G.; Windsor, D. P.; Eppleston, J.; Setchell, B. P. & Maxwell, W. M. C. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*, 20, 280-288.
- Shirasuna, K.; Nitta, A.; Sineenard, J.; Shimizu, T.; Bollwein, H. & Miyamoto, A. 2012. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic Animal Endocrinology*, 43, 198-211.
- Windsor, D. P. 1995. Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. *Theriogenology*, 43, 1009-1018.
- Wulster-Radcliffe, M. C. & Lewis, G. S. 2002. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology*, 58, 1361-1371.
- Wulster-Radcliffe, M. C.; Wang, S. & Lewis, G. S. 2004. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62, 990-1002.

Recebido em Junho 9, 2014

Aceito em Setembro 3, 2014

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited