

MANEIO REPRODUTIVO EM OVINOS E CAPRINOS

7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS E CAPRINOS

Por: Ramiro Valentim² / Isilda Rodrigues⁴ / Teresa Montenegro² / Sandra Sacoto^{3,4} / Jorge Azevedo^{1,3,4} / Maria José Gomes⁴

¹jazevedo@utad.pt

²CIMO, ESAB, IPB; ³CECAV; ⁴UTAD

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) em pequenos ruminantes-ovinos e caprinos - continua ainda, apesar de vários esforços, a não constituir uma prática corrente nas explorações portuguesas. A pequena dimensão dos rebanhos e cabradas, com tendência para diminuir, principalmente no Norte do país, dificuldades na deposição do sêmen no corpo do útero (1), na conservação do sêmen (2), menores taxas de fertilidade aparente (relativamente à monta natural) (1), necessidade de mão-de-obra especializada, (3) maiores custos, o envelhecimento da população e a falta de interesse por parte dos mais jovens são os principais constrangimentos apontados à difusão da inseminação artificial, nestas espécies.

Em Espanha, a inseminação artificial em ovinos e caprinos não surge como uma técnica de eleição para a reprodução em si, mas está fortemente ligada a programas de melhoramento das raças (3). Também em França, apesar do número elevado de inseminações que se realizam, esta prática está normalmente associada a programas de melhoramento das respetivas raças (4). No entanto, em alguns países como por exemplo o Brasil e a Nova Zelândia, esta técnica atinge uma dimensão muito mais expressiva.

Apesar dos constrangimentos à utilização da IA nestas espécies, é fundamental, dada a sua precocidade em termos produtivos e reprodutivos, apresentando ciclos éstricos curtos (17 dias nos ovinos e 21 dias nos caprinos) (5), tendo desta forma intervalos entre gerações curtos que exigem renovação rápida de reprodutores, para se evitar a consanguinidade. A IA, quando associada a programas de melhoramento, permite acelerar o progresso genético através da testagem dos jovens machos sobre a sua descendência, ou pela introdução da seleção assistida por marcadores moleculares proporcionando a difusão dos melhores animais ou simplesmente dos machos, aumentando a sua descendência, uma vez que um só ejaculado permite inseminar várias fêmeas (6).



A IA permite evitar a difusão de doenças venéreas ou de transmissão sexual desde que se tomemos cuidados adequados. Permite ainda a obtenção de sêmen de reprodutores doutras regiões ou países, ou mesmo a utilização de material seminal de machos que já morreram. Em termos de maneio, a IA permite identificar com facilidade fêmeas que não entram em cio e ter um maior controlo dos partos em datas mais precisas e adequadas às exigências do mercado. Por outro lado, para que a IA obtenha o sucesso desejado, deveremos desenvolver as infraestruturas necessárias, com a atuação de grupos de trabalho coordenados e especializados.

Passaremos, de seguida, a analisar alguns dos fatores que poderão condicionar o sucesso da prática da IA.

OBTENÇÃO DE SÊMEN

O sêmen pode ser utilizado fresco (temperatura $\approx 30^{\circ}\text{C}$), refrigerado ($10-15^{\circ}\text{C}$ ou mesmo 5°C) ou congelado (-196°C) (6).

A resposta do sêmen à criopreservação varia entre machos da mesma espécie assim como entre espécies diferentes; de uma maneira geral, o sêmen dos pequenos ruminantes é extremamente sensível à criopreservação quando comparado com o de outras espécies (2).

No caso de se usar sêmen congelado para IA em ovinos e caprinos, este deve ser descongelado num banho-maria a 37°C durante 30 segundos ou a 50°C durante 9 segundos. O material utilizado na inseminação deve estar aquecido a uma temperatura próxima dos 37°C . Por cada lote de sêmen descongelado dever-se-á realizar análises seminais para inferir a qualidade deste, após descongelamento (3).

No caso de ser necessário recolher sêmen, este poderá ser obtido basicamente de duas maneiras:

- recorrendo a uma vagina artificial, com machos treinados;
- por eletroejaculação.

Este último método só deverá ser utilizado se não houver outra alternativa, dada a possibi-

lidade de contaminação com urina e ser algo traumático para o animal (1).

Em ambos os métodos, após a ejaculação, o tubo contendo o sêmen é removido e mantido em banho-maria a 30°C até atingir a mesma temperatura, devendo ser avaliado o volume, cor, aspeto, concentração, motilidade, viabilidade (análise da integridade da membrana) e funcionalidade espermática, grau de capacitação espermática e percentagem de espermatozoides apoptóticos (7). Parte destas análises já podem ser feitas de uma forma computadorizada usando, por exemplo, o software "CASA" (8).

Os diluidores utilizados são importantes (estes devem estar sempre à mesma temperatura do sêmen, quando estão a ser adicionados) na expansão do volume seminal, permitindo o seu fracionamento, a preservação do sêmen tanto na refrigeração como na congelação associado a criopreservadores, como o glicerol.

A motilidade e a concentração é que vão determinar o nível de diluição do sêmen (3). Existem vários tipos de diluidores de sêmen: naturais (como o leite de vaca, a água de coco ou gel de aloe vera) (3,9) ou sintéticos. De uma maneira geral estes diluidores devem estabilizar o pH, manter a osmolaridade adequada e proporcionar uma fonte energética para os espermatozoides, para além de os proteger do choque térmico provocado pelas baixas temperaturas. Como crioprotetor, até aos 5°C, usa-se geralmente a gema de ovo. Já para temperaturas mais baixas, recomenda-se a utilização de outros crioprotetores como o glicerol (1,3).

O sêmen do bode é menos concentrado que o sêmen de carneiro, pelo que a proporção de diluição também deverá ser menor para aquela espécie (5). Outra particularidade do sêmen de carneiro é que o plasma seminal deve ser retirado por centrifugação devido a possuir uma concentração elevada de lipases que vão interagir com alguns constituintes dos diluentes de sêmen mais utilizados como a gema de ovo e o leite, embora alguns autores não corroborem totalmente com esta opinião (2,10). Assim, a concentração deve ser calculada, logo após a centrifugação, antes da diluição (5). Também nos ovinos, para determinados fins como por exemplo para a fecundação *in vitro* (FIV) procedem-se a lavagens do sêmen para eliminar o plasma seminal ou mesmo retirar espermatozoides mortos ou selecionar colónias com maior motilidade e, por vezes, com maior viabilidade, o que é conseguido pelo método de "Swim-up" e suas variantes (7).

ESCOLHA DO LOTE DE FÊMEAS PARA INSEMINAR

O lote das fêmeas a inseminar é de extrema importância já que constituem parte fundamental do processo da IA. Assim, em primeiro lugar, as fêmeas devem ser saudáveis e sem problemas reprodutivos, não fazerem parte do grupo de animais que não ficaram prenhes na época de cobrição anterior, devem constituir um lote homogêneo, no que respeita ao desenvolvimento produtivo e fisiológico - no míni-

mo devem ter um peso vivo correspondente a aproximadamente 65% do peso vivo adulto - e apresentar uma notação da condição corporal entre o 3 e o 4 (11). Não devem ter mais de 5 ou 4 anos de idade (no caso das cabras) (12) e dependendo da técnica de IA utilizada é aconselhável uma exploração ginecológica e nas chibas um rompimento do hímen, 15 dias antes de um tratamento de sincronização do estro (12). No caso de não serem primíparas, o intervalo entre a última parição e a IA seguinte não deve ser inferior a 10 semanas (12).

MÉTODO DE SINCRONIZAÇÃO E/OU INDUÇÃO DO ESTRO

Não é do âmbito deste artigo descrever exaustivamente os métodos de sincronização/ indução do estro, mas como estes são de extrema importância para o sucesso da IA faremos uma breve alusão aos mais utilizados e ao melhor momento para se proceder à IA (13-17).

A necessidade de se sincronizaraios, quando se vai recorrer à técnica de IA, advém do facto de se simplificar o maneio, quando se pretende intensificar a produção e poder determinar com maior exatidão o melhor momento para se proceder à IA, permitindo assim inseminar a tempo fixo (18,19). À medida que a latitude aumenta, tanto os ovinos como os caprinos expressam gradualmente uma maior sazonalidade reprodutiva ficando naturalmente a época de reprodução restrita aos dias em que o fotoperíodo está a decrescer (19,20). Assim, estas técnicas de sincronização e/ou indução de cio, utilizadas individualmente ou em combinação, podem ser aplicadas em determinadas épocas do ano, resolvendo alguns destes problemas. O controlo da atividade reprodutiva é, normalmente, mais eficaz na estação reprodutiva (sincronização da atividade ovárica) do que na época de anestro (indução da atividade ovárica) (14,17). Não existe um protocolo único universalmente aceite de controlo da atividade reprodutiva. Na verdade, o protocolo a aplicar deve ser ajustado a cada situação em concreto. Nos pequenos ruminantes, o controlo da atividade reprodutiva assenta, essencialmente, na utilização de fármacos (progestagénios e/ou prostaglandinas - PGF_{2α}) e na bioestimulação ("efeito macho" e "efeito fêmea"). O maneio alimentar também pode ser usado na ampliação da resposta (17).

Os métodos de manipulação do ciclo estrico, podem ser naturais (como o efeito macho e programas de luz), ou recorrendo à utiliza-



ção de fármacos como progestagénios, prostaglandinas ou ainda a melatonina (20). Normalmente estes métodos são complementados por fármacos que, mediante a dose utilizada, podem simplesmente induzir a ovulação ou provocar superovulações (PMSG, hCG e eCG) (21). O primeiro efeito (indução) é muitas vezes necessário devido à depressão na fertilidade que alguns destes métodos de sincronização causam, ou porque, efetivamente se vai pretender aumentar a prolificidade (17,21).

TÉCNICAS DE INSEMINAÇÃO

Nos ovinos e caprinos podemos distinguir 4 técnicas de IA em função da região anatómica onde se efetuará a deposição do sémen (Figura 1).

- **A inseminação vaginal (VAI; Figura 1A)** é uma técnica simples e consiste na deposição do sémen na vagina, o mais profundo possível, sem a preocupação de localizar a cérvix. Utiliza-se sémen fresco ou diluído ($0,2\text{ml}$), com uma concentração espermática de 200×10^6 a 400×10^6 espermatozoides por dose (5). O sémen congelado não é recomendado nesta técnica de IA. A ovelha permanece em estação e o estilete de inseminação é inserido aproximadamente 13 cm. O índice de fertilidade é de 40 a 65% (5). Utilizando o cio natural a IA deve ser realizada 12 a 18h após o início do cio (22). Nos caprinos, esta técnica está contraindicada devido aos baixos resultados de fertilidade (12), facilmente ultrapassáveis por outras técnicas existentes.
- **A inseminação cervical (CAI; Figura 1B e C)** consiste na deposição de sémen no interior da cérvix (1 a 3 cm de profundidade). Utiliza-se um espéculo vaginal para visualização da cérvix e insere-se o estilete de inseminação de 10-14 cm. Geralmente, utiliza-se sémen fresco, podendo também utilizar-se sémen refrigerado na concentração de 100×10^6 a 200×10^6 espermatozoides/ml, apresentando taxas de fertilidade de 60 a 70% (5,23).

A fertilidade obtida por inseminação cervical, com sémen congelado, aumenta de acordo com o número de anéis ultrapassados ou o grau de penetração do estilete de inseminação. No entanto é muito importante não forçar a entrada do estilete de inseminação para não provocar lesões (6,24).

A inseminação cervical em ovinos deverá ser realizada entre 48 a 60 horas após

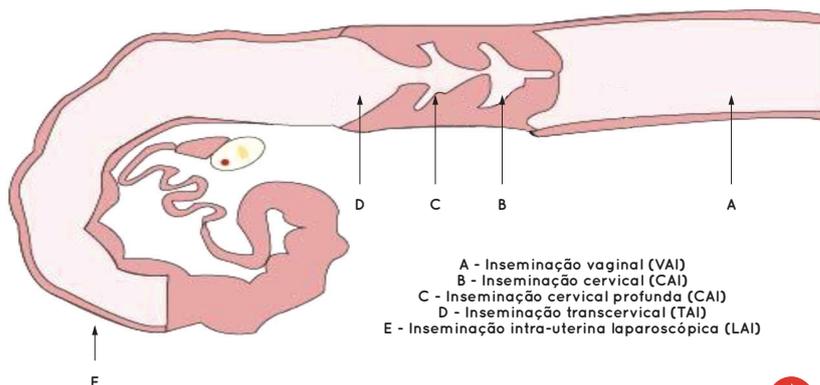


Figura 1

Esquema representativo (pequenos ruminantes) dos vários tipos de IA e respetiva região anatómica da deposição de sémen. (Montenegro, 2015).

a remoção das esponjas vaginais (tratamento com progestagénios) (5,25). Assim, se se recorrer a inseminação dupla esta deverá ser realizada 48 e 60h após a remoção das esponjas vaginais. Optando-se por uma única inseminação, esta deverá ser realizada 55h após a retirada das esponjas (5). Se a sincronização foi feita com prostaglandinas (PG) o momento ótimo de inseminação é mais difícil de calcular, devendo ser feito um estudo prévio do protocolo a aplicar na raça em questão (26). Em caprinos a inseminação, após sincronização com PG, deve ser realizada 16-18h após o início do cio (19).

- **A Inseminação transcervical (TAI) (Figura 1D)** baseia-se na localização, retração e estabilização da cérvix, permitindo uma penetração intrauterina. Para o conseguir utiliza-se um vaginoscópio, uma fonte de luz e outros instrumentos para fixar a cérvix (1,5). A penetração cervical é conseguida entre 70% a 90% das ovelhas (5). No entanto, a deposição intrauterina de sémen só tem um sucesso de 60% nas cabras e apenas 6% nas ovelhas (6). Nos ovinos, a dificuldade é acrescida, na passagem do estilete de inseminação causada pela anatomia da cérvix que se apresenta como um canal estreito com 4-7 anéis ou pregas.



Frequentemente a segunda e a terceira pregas encontram-se desalinhadas com a primeira, levando a que seja necessário fazer o pinçamento da parede adjacente à projeção externa da cérvix para tracionamento desta estrutura uterina (1). Estas dificuldades conduzem a uma fertilidade de ≈90% com sémen fresco e apenas de 22 a 51% com sémen congelado (5). As ovelhas escolhidas para esta técnica devem apresentar uma morfologia e desenvolvimento corporal adequados e serem múltiparas (5). Este tipo de inseminação pode ser auxiliado pela administração de ácido hialurónico que provoca um certo relaxamento da cérvix (27). Hoje em dia a existência no mercado de um estilete para inseminação ovina com função expansora, poderá vir a melhorar alguns resultados (28). Em caprinos, o processo de TAI está mais facilitado pela presença apenas de 4-5 pregas que poderão ser ultrapassadas mediante algumas manobras, tornando a inseminação intrauterina por via transcervical possível e fácil de executar, sendo apenas necessário fazer o pinçamento sem tração. Também nesta espécie, o momento ótimo para a inseminação, em fêmeas sincronizadas com PG, ronda as 72h após a última injeção de PG, segundo uma nova metodologia desenvolvida por (29).

- **A inseminação intrauterina por laparoscopia (LAI; Figura 1E)** consiste na deposição de uma pequena dose seminal diretamente nos cornos uterinos através de laparoscopia. Nos caprinos, normalmente usam-se 120 milhões de espermatozoides móveis e nos ovinos 10-12 milhões. (30). O sémen utilizado pode ter sido conservado por congelação atingindo-se taxas de fertilidade entre os 65 e os 80% (5). Esta técnica é mais utilizada em ovinos do que em caprinos devido a diferenças anatómicas que a justificam. A fêmea deve ser coloca-

da em decúbito dorsal com uma inclinação de 45°, posição “Trendelenburg”. O animal deverá fazer jejum de 24-36 horas e a água deverá ser retirada apenas 12 horas antes da intervenção. Normalmente é aplicado um tranquilizante ao animal, para além de uma anestesia local (2-4 centímetros da linha média e de 8 a 10 centímetros da glândula mamária) (1). A perfuração é feita em dois pontos da linha média, com o auxílio de trocateres; num dos orifícios é introduzido o laparoscópio e no outro o estilete de inseminação e insuflado CO₂ (através de uma agulha de “Veress”) (31). A agulha para inseminação deverá ser posicionada num dos cornos uterinos (não é importante verificar o ovário para determinar o lado em que se deu a ovulação), visto que em cabras os espermatozoides migram de um corno uterino para o outro e vice versa (32). Nos ovinos, alguns autores relatam uma maior fertilidade quando se inseminam nos dois cornos uterinos, metade da dose em cada um deles (33). Embora a LAI seja a técnica de IA que maiores índices de fertilidade atinge com sémen congelado ovino, teremos que contabilizar a necessidade de pessoal especializado e os custos inerentes à técnica.

CONCLUSÃO

A difusão da inseminação artificial em ovinos e caprinos deve ser sempre acompanhada de conhecimentos inerentes às espécies e adaptadas ao local e ao sistema de exploração onde se vai efetuar. Na escolha da técnica de IA deverá ser sempre ponderada a disponibilidade de recursos, a eficiência obtida e os custos inerentes. O sucesso da IA é multifatorial, assim o sémen utilizado deve ser de elevado padrão qualitativo, as fêmeas utilizadas devem ser criteriosamente selecionadas e as técnicas de IA escolhidas minuciosamente e executadas por técnicos competentes. ■



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferra, J. C. e J.R.B. Sereno, Inseminação Artificial em Ovinos, ed. D.D.E.C. Planaltina. 2006.
2. Kucuk, N., et al., Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, 2014. 68(3): p. 327-31.
3. Palacios, C.R., Manejo del semen e inseminación artificial in Manejo reproductivo en ganado ovino, SERVET, Editor. 2010, Abecia, A. M. y Forcada, F. M.: España.
4. Leboeuf B, et al., Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science*, 1998. 55: p. 193-203.
5. Ax, R., L., et al., Inseminação artificial, in *Reprodução Animal*, 7 ed., Manole, Editor. 2004, Hafez, E.S.E., Hafez, B. p. 531.
6. Fonseca, J.F., et al. I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia. Ilhéus, BA-UESC. 2010.
7. Cebrián, J.A., et al., Obtención del semen, in Manejo reproductivo en ganado ovino, SERVET, Editor. 2010, Abecia, A. M. y Forcada, F. M.: España.
8. Matos, D.L., et al., Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review*. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, 2008. 32(4): p. 225-32.
9. Rodriguez, F., et al., Cervical Versus Intrauterine Insemination of Ewes Using Fresh or Frozen-Semen Diluted with Aloe Vera Gel. *Theriogenology*, 1988. 30(5): p. 843-854.
10. Ritar, A.J., P.D. Ball e P.J. O'May, Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 1990. 2(1): p. 27-34.
11. Russel, A., *Body Condition Scoring of sheep and goat*, in *Sheep and goat Practice*, E. Boden e B. Tindall, Editors. 1991: Philadelphia p. 272.
12. Simões, J., R. Mascarenhas G. Baril, Inseminação artificial em caprinos. E-book para técnicos de expressão portuguesa. 2008. 44.
13. Azevedo, J.M.T., et al., Sincronização de celos y diagnóstico precoz de gestación en ovelhas Churras da Terra Quente e Ile de France. *Producción Ovina e Caprina*, Revista de la SEOC, 2002. 27: p. 973-977.
14. Azevedo, J.M., R. Valentim e T. Correia, Control hormonal de la actividad ovárica en ovinos, in *Albérta - Publicación Veterinaria Independiente*. 2006. p. 6-8.
15. Valentim, R., et al., Tratamientos cortos con diferentes dosis de FGA a finales de la estación de anestro de cabras de raza Serrana, in XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovino-ecología y Caprinotecnia. 2010, Valladolid, Espanha.
16. Valentim, R., et al., Progestagen treatment associated with different doses of eCG to advance the breeding season in churra galega bragançana ewes. in *Reproduction in Domestic Animals*. 2010.
17. Correia, T.M. e R. Valentim, Contributo para a melhoria da eficácia reprodutiva de ovinos da raça Churra Galega Bragançana e de caprinos da raça Serrana, in Fórum CIMO - Ciência e Desenvolvimento 2012. 2012, Bragança.
18. Olivera-Muzante, J., et al., Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 2011. 75(7): p. 1232-1238.
19. Al Yacoub, A.N., et al., Fixed-time deep uterine insemination in PGF(2 alpha)-synchronized goats. *Theriogenology*, 2011. 76(9): p. 1730-1735.
20. Valentim, R.C., T.M. Correia e J.M.T. Azevedo, Utilização de implantes de melatonina em ovinos, in *Albérta - Publicação Veterinária Independiente*. 2006. p. 18-22.
21. Valentim, R., et al., Utilização de um tratamento progestagónico longo e de diferentes doses de eCG no controlo da actividade reprodutiva em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana, in V Congresso Ciências Veterinárias. 2011, Fonte Boa, Santarém.
22. Bettencourt, E.M.V., Caracterização de Parâmetros Reprodutivos nas Raças Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça, in *FMV*. 1999, UTL: Lisboa. p. 126.
23. Valentim, R., et al., Anticipación de la estación reproductiva en ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial, in 34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovino-ecología y Caprinotecnia. 2009, Barbastró, Espanha.
24. Ritar, A.J. e S. Salamon, Fertility of Fresh and Frozen-Thawed Semen of the Angora Goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1983. 36(1): p. 49-59.
25. Donovan A, et al., Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. *Animal Reproduction Science*, 2004. 84(3-4): p. 359-368.
26. Fierro, S., et al., The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology*, 2013. 79(3): p. 399-408.
27. Perry, K., et al., Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, 2010. 74(9): p. 1685-90.
28. Wulster-Radcliffe MC e Lewis GS, 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*, 2002. 58(7): p. 1361-1371.
29. Bowdridge, E.C., et al., NCSynch: A novel, progesterone-free protocol for ovulation synchronization and timed artificial insemination in goats. *Small Ruminant Research*, 2012. 110(1): p. 42-5.
30. Gordon, I., *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. 1997, Cambridge. UK CABI Publishing University press. 450.
31. Correia, T.M., Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra da Terra Quente. 1996, Instituto Agronómico Mediterrâneo de Saragoça. p. 84.
32. Anakkul, N., et al., Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. *Theriogenology*, 2014. 82(8): p. 1137-44.
33. Perkins, N.R., J.R. Hill e R.G. Pedrana, Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized Merino ewes. *Theriogenology*, 1996. 46(3): p. 541-5.