

TRANSPORTE ESPERMÁTICO EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO

JOÃO RICARDO MALHEIROS DE SOUZA¹; LUZIA HALLAL DUVAL¹; VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA¹; ANELISE HAMMES PIMENTEL¹; SANDRA MARA DA ENCARNAÇÃO FIALA RECHSTEINER¹

¹ HISTOREP- Departamento de Morfologia- IB/UFPEL – joao.rms@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução é uma ferramenta a serviço da equideocultura mundial. Entre as inúmeras inovações, a inseminação artificial revela-se importante ao possibilitar a manipulação do ejaculado de um reprodutor fora do trato reprodutivo da fêmea.

Acredita-se que os árabes tenham introduzido a técnica de inseminação artificial na espécie equina em 1322, no entanto, o primeiro registro real de investigação nesta área foi realizado por Spalanzani, em 1776 (BOWEN, 1969).

Na criação de equinos, as técnicas de reprodução assistida têm por objetivo aumentar a eficiência reprodutiva de indivíduos destacados por suas características, resultados ou progênie, visando um melhor aproveitamento de seus genótipos.

A criopreservação do sêmen, associada à inseminação artificial, oferece muitas vantagens à indústria da produção animal (SALAMON e MAXWELL, 1995). Mesmo que para alguns reprodutores, a conservação dos espermatozoides pelo frio seja um problema, devido a alterações biológicas e funcionais das células, estas, quando criopreservados podem ser utilizadas independentemente da distribuição geográfica ou idade do reprodutor.

Quando é realizada a cobertura natural ou a inseminação artificial, com a deposição do sêmen no corpo do útero, alguns poucos espermatozoides férteis e em estágio de maturação adequado são rapidamente transportados, sob influência da contração uterina, até a tuba uterina (KATILA, 1997). Em éguas inseminadas pós-ovulação observa-se a presença de espermatozoides nas tubas uterinas duas horas após a inseminação, porém em número extremamente baixo, aumentando substancialmente quatro horas após a inseminação artificial (BADER E KRAUSE, 1980; BADER, 1982).

Segundo SCOTT et al. (1994), quatro horas após a inseminação artificial, o número de espermatozoides na tuba uterina diminui, provavelmente por eliminação ou por diminuição do aporte de espermatozoides. Em éguas inseminadas antes da ovulação, espermatozoides móveis e com acrossoma intacto são identificados no istmo do tuba uterina 4 horas após a deposição do sêmen.

Estudos sobre o transporte espermático após a inseminação artificial com baixo volume de sêmen, na ponta do corno uterino não foram ainda realizados, embora essa técnica seja amplamente utilizada na criação de equinos.

Com base nestes resultados, busca-se através deste projeto, estudar o transporte espermático quando utilizado sêmen congelado na inseminação artificial.

2. METODOLOGIA

O experimento está sendo desenvolvido em um frigorífico de equinos em Montevidéu, no Uruguai. Serão utilizadas 100 éguas destinadas ao abate com condição corporal mínima 2 (HENNECKE et al., 1983, modificada por MALSCHITZKY, 1998).

Todas as éguas utilizadas no experimento serão submetidas a exame ginecológico, com exames bacteriológico e citológico antes de serem incluídas nos grupos experimentais.

Os animais serão submetidos à palpação retal e à ultrassonografia, onde serão considerados a ecotextura do útero, o conteúdo uterino (CURNOW, 1991) e a atividade ovariana. As que apresentarem imagem uterina compatível com cio e que possuírem folículos de tamanho igual ou superior a 30 mm serão selecionadas para o experimento.

O exame bacteriológico do lúmen uterino será realizado após assepsia com água e detergente neutro e secagem com papel toalha, tomando-se os devidos cuidados para evitar a entrada de água, na vagina. Após a fixação do colo uterino, um cefanete será introduzido na luz uterina com o auxílio de uma pinça (MERKT et al., 1980). O material será coletado por meio de movimentos rotativos e posteriormente semeado em Agar Sangue ovino entre 5 e 8%, a 37°C, por 24-48 horas. Se houver crescimento de bactérias Gram negativas, será realizada cultura em meio de Agar Mac Conkey (VAZ et al., 1979; RICKETTS, et al., 1993). Somente serão utilizadas no experimento éguas que não apresentarem crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos.

O exame citológico será realizado através da coleta de material com cefanete introduzido no útero das éguas, seguindo o mesmo procedimento utilizado para o exame bacteriológico (MATTOS et al., 1984). O cefanete será rolado em uma lâmina, posteriormente corada com Panótico Pappenheim e avaliada, sob microscopia óptica, quanto à presença de neutrófilos. Só serão utilizadas no experimento éguas que não apresentarem neutrófilos ao exame citológico.

O sêmen de dois garanhões de fertilidade conhecida serão coletados através de vagina artificial modelo Hannover. Após a coleta será efetuada a verificação da motilidade, concentração e morfologia espermática e processadas as amostras para o congelamento. As éguas selecionadas receberão aleatoriamente um dos seguintes tratamentos: Tratamento 1: Inseminação artificial com sêmen congelado 1×10^6 espermatozoides diluído em leite desnatado, totalizando um volume final de 5 ml, na ponta do corno uterino; Tratamento 2: Inseminação artificial com sêmen congelado 2×10^6 espermatozoides diluído em leite desnatado, totalizando um volume final de 5 ml, na ponta do corno uterino; Tratamento 3: Inseminação artificial com sêmen congelado 8×10^6 espermatozoides diluído em leite desnatado, totalizando um volume final de 5 ml, corpo do útero.

As éguas submetidas aos diferentes tratamentos serão abatidas 2h, 4h, 12h ou 24h após o tratamento. Após o abate, o útero será separado das tubas uterinas e da junção útero-tubárica (JUT) e lavado 3 vezes com 50 ml de PBS (solução salina fosfatada tamponada), através de catéter de Foley introduzido pela extremidade do corno direito, estando a abertura da cérvix e extremidade distal do corno esquerdo obstruídas por pinças. O fluido coletado em três lavagens será reservado e, ao final, uma alíquota de cada amostra de líquido será colocada câmara de Neubauer e examinada em microscópio óptico, sendo feita a contagem dos espermatozoides.

Em todas as éguas do experimento, a tuba uterina ipsilateral ao folículo dominante e a tuba uterina contralateral serão lavadas com 1 ml de PBS, a partir do infundíbulo, e uma amostra do lavado será colocada em câmara de Neubauer para a contagem de espermatozoides.

Nas éguas em que não foi realizada a lavagem do útero, serão coletados três fragmentos endometriais para histologia uterina, um de cada corno uterino e um do corpo do útero, com auxílio de uma tesoura. Os fragmentos serão fixados em solução de BOUIN por, 48 h e, a seguir, lavados em álcool 70^o, processados e corados pela técnica hematoxilina e eosina. Após a confecção da lâmina, será feita a leitura através de microscopia óptica. As lâminas serão analisadas na busca de espermatozoides dentro das glândulas do útero e no epitélio.

Os dados serão analisados através de análises descritivas (tabelas de frequência), regressão linear e x^2 .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de espermatozoides nos ovidutos é esperada a partir de 30 minutos após a IA, conforme identificado por FIALA et al. (2008). Assim como, semelhanças com os achados utilizando sêmen resfriado encontrados por FIALA et al (2010), em que éguas foram inseminadas com 500×10^6 milhões de espermatozóides e sacrificados em diferentes momentos após a inseminação, onde se observou a presença de espermatozoides nas glândulas uterinas e no epitélio do lúmen uterino, sugerindo que as glândulas uterinas podem atuar como um reservatório de espermatozoides como em outras espécies.

Também esperava-se uma distribuição de espermatozoides semelhante nos cornos uterinos e tubas, comprovando que estes se distribuem uniformemente, independentemente da localização do folículo dominante. Uma diminuição no número de espermatozoides tanto no útero (epitélio e glândulas) como na e JUT e ovidutos também é esperada (FIALA et al. 2010).

4. CONCLUSÕES

Espermatozoides são encontrados tanto nas glândulas uterinas quanto no lúmen do útero, logo após a IA, permanecendo nestes locais por várias horas. Os primeiros espermatozoides já estão presentes nos ovidutos 30 minutos após a inseminação e podem ser ali observados por no mínimo 24 horas, não havendo diferença no número de espermatozoides observado nos ovidutos ipsi e contralateral ao folículo dominante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADER, H., 1982. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **J. Reprod. Fertil.**, 32 :59-64.

BADER H., KRAUSE, A., 1980. Investigations about the transport, distribution and the fate of the spermatozoa in the genital tract of the mare. **Proc. 9TH Int Cong Anim. Reprod. & AI** 5:197-205.

BOWEN, J. M. Artificial insemination in the horse. **Equine Vet. J.** 1969, v. 1, p. 98-110.

CURNOW, E.M., 1991. Ultrasonography of the mare`s uterus. **Eq. Vet. Educ.** 3 (4) :190-193.

FIALA MS, PIMENTEL CA, MATTOS ALG, GREGORY RM, MATTOS RM. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v.67, p.556–562, 2007.

Fiala SM, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Sperm distribution in the oviduct and uterus of mares within two hours after artificial insemination. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 96-98, 2008.

Fiala SM, Cruz LA, rodrigues R, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Sperm cells in the reproductive tract of the mare: where can we find them? **Pferdeheilkunde**, v.26, p.19-21, 2010.

KATILA, T. 1997. Interactions of the uterus and semen. **Pferdeheilkunde**, 13 (5) : 508-511.

HENNECKE, D.R., POTTER, G.D., KREIDER, J.L., YEATES, B.F. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Eq. Vet. J.** 15 (4) : 371-372.

MALSCHITZKY , E. 1998. **Efeito de diferentes tratamentos pós-cobertura na fertilidade de éguas Puro Sangue de Corrida**. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre.

MERKT, H. , BISPING, W. , GÜNZEL, A-R., KIRPAL, G., 1980. Die Tupferprobe in der ginäkologischen Untersuchung der Stute. **Der Praktische Tierarzt**, 61 :301-308.

RICKETTS, S.W.; YOUNG, A. & MEDICI, E.B. 1993. Uterine and clitoral cultures. In: McKinnon, A.O. & Voss, J.L. (Ed.), **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. : 234-245.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SCOTT M.A., LIU, IKM., OVERSTREET, J.W., 1995. Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical importance. **Proc. Am. Assoc. Eq. Pract.** 41:1-2.

VAZ, A.K.; RISCH, A.L.C. & BRENDLER, R., 1979. Infecções genitais em éguas na região de Bagé, RS. **Turf & Fomento**, março/abril, : 102-103.