

**RENATA CASALI**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO, INDUÇÃO / SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLÍCULAR EM OVELHAS E ADITIVOS NO CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.  
Orientador: Doutor Alceu Mezzalira  
Co-orientador: Doutor Alejo Menchaca

**LAGES  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Casali, Renata

Avaliação de métodos de inseminação, indução /  
sincronização da onda folicular em ovelhas e aditivos  
no congelamento de sêmen ovino / Renata Casali. -  
Lages , 2018.

81 p.

Orientador: ALCEU MEZZALIRA

Co-orientador: ALEJO MENCHACA

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2018.

1. Trealose. 2. GnRH. 3. Estradiol. 4. Plasma  
Seminal. I. MEZZALIRA, ALCEU . II. MENCHACA, ALEJO.  
, .III. Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

RENATA CASALI

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO, INDUÇÃO / SINCRONIZAÇÃO DA ONDA  
FOLÍCULAR EM OVELHAS E ADITIVOS NO CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração Produção Animal.

Banca Examinadora:

Dr. Alceu Mezzalira – Orientador - Universidade do Estado de Santa Catarina

Dr. Arnaldo Diniz Vieira / Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Dr. Lucio Pereira Rauber / Intituto Federal Catarinense - Campus Concórdia

Dr. Marcos Henrique Barreta / Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dr. Rogério Ferreira / Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 23 de Março de 2018.



## **AGRADECIMENTOS**

Aos colegas de laboratório Guilherme, Luana, Rafael, Gabriel, Gisele, Camila, Joana e Lain e tantos outros que colaboraram diretamente ou indiretamente para a concretização do trabalho.

Aos professores e amigos, que proporcionaram condições para que este trabalho fosse executado, enfatizando meu orientador Alceu Mezzalira que participou dos diferentes momentos da tese desde a parte intelectual passando pela execução e desenvolvimento do material escrito.

A equipe IRAUY que permitiu o desenvolvimento dos experimentos, disponibilizando campo experimental e pessoal, em destaque Alejo Menchaca, Andrea, Richard, Federico, Pedro Claudino, Manuel, Nicolas e Carlos. Aos amigos Rafael e Pedro por se deslocarem do Brasil para ajudar no desenvolvimento do experimento no Uruguai.

Àqueles que não mediram esforços para que eu pudesse correr atrás do meu sonho: meu pai, Moacir e minha mãe, Denisete. Cito também minhas irmãs: Débora e Jéssica, grandes amigas e peças primordiais em minhas decisões.

Aos amigos feitos durante o doutorado que me proporcionaram tardes de estudos aliadas a diversão e a tantos outros que passaram pela minha vida neste período, e que de certa forma, deram a sua contribuição.

Aos financiadores UDESC, PROMOP, CNPQ, CAPES e IRAUY, pelo apoio financeiro.



## RESUMO

**CASALI, R. Avaliação de métodos de inseminação, indução / sincronização da onda folícular em ovelhas e aditivos no congelamento de sêmen ovino.** 2018. 81 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal. Área: Produção Animal)–Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2018.

A ovinocultura encontra-se estagnada no aspecto econômico pela inexistência de uma produção constante e padronizada de carne e leite. Uma das causas é a dificuldade de execução da IA transcervical, em função da anatomia tortuosa da cérvix ovina, determinando que historicamente o sêmen ovino congelado esteja condicionado a inseminação por laparoscopia. Isto demonstra a necessidade de se buscar alternativas que possibilitem o emprego da IA cervical. Igualmente importante é a definição de um protocolo de sincronização que permita concentrar a ovulação em ovelhas, oportunizado o encontro dos gametas no momento mais adequado. Outro importante quesito para possibilitar o melhoramento genético dos ovinos, preconiza o aumento da eficiência da criopreservação do sêmen. Buscando superar estes obstáculos, quatro estudos foram conduzidos. O primeiro estudo comparou o método de inseminação transcervical com os métodos de inseminação cervical superficial e inseminação por laparoscópica. O segundo estudo avaliou o emprego de benzoato de estradiol (BE) no início de protocolo curto de sincronização, utilizando implantes de progesterona de terceiro uso. Neste estudo também foi avaliado o emprego de GnRH, como indutor de ovulação. O diagnóstico de gestação dos estudos 1 e 2 foi realizado 30 dias após a IA, por ultrassonografia. O terceiro estudo avaliou a dinâmica folicular de ovelhas submetidas ao protocolo do estudo 2, para um melhor entendimento dos resultados observados. O estudo 4 avaliou a qualidade do sêmen ovino congelado com a adição de trealose e da associação trealose + plasma seminal equino (PSLE), ao diluente. Foram avaliadas a motilidade e vigor no decorrer do teste de termo resistência (TTR), a integridade de membrana por teste hiposmótico, a migração espermática após *swim up*, além da morfologia espermática. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando necessário a testes de comparação de médias, com nível de significância de 5%. Os resultados obtidos no estudo 1 demonstraram que quando o sêmen foi depositado no útero, proporcionou maior taxa de prenhez, o que foi alcançado em todas as fêmeas, somente por laparoscopia. Na inseminação transcervical, a taxa de prenhez foi intermediária (42,3%), entre a inseminação cervical e laparoscopia (36,0% e 50,2%;  $P < 0,05$ ), sendo maior nas ovelhas em que o sêmen foi depositado a uma profundidade superior a 4 cm da cervix (60,0% versus 35,1%). Todavia, a deposição intrauterina foi possível em menos de 30% das ovelhas com inseminação transcervical. O estudo 2 demonstrou maior taxa de prenhez quando foi empregado o BE no início de protocolos curtos (com BE = 46,4%, sem BE = 40,4%). Já o emprego do GnRH como indutor de ovulação, não trouxe benefícios na taxa de prenhez (com GnRH – 43,9% e sem GnRH – 43%). Os dados do experimento 3 estão sendo avaliados, porém pode-se observar que o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi 8,6 mm para o grupo sem BE e sem GnRH, 7,7 mm para o grupo sem BE com GnRH, 7,5 mm para o grupo com BE e sem GnRH e 7,3 mm para com BE e com GnRH. Em 12 das 40 ovelhas, foi observado cio durante o protocolo, sendo que em 10 o cí ocorrreu nas primeiras 48 horas após a aplicação do BE, indicando um provável efeito colateral. O estudo 4 demonstrou que a trealose e a associação de trealose com PSLE melhora a motilidade e o vigor (controle = 36,5%/3, trealose+plasma= 42%/3,3 e trealose = 43,5%/3,3), a integridade de membrana (controle = 25,8%, trealose+plasma = 38,6% e trealose = 32,7%), bem como a migração espermática após *swim up*. Os experimentos realizados permitiram contribuir em quesitos para a

obtenção de melhores taxas de prenhez em ovelhas. Por fim, o estudo possibilitou o avanço em alguns fatores que dificultam a difusão das biotécnicas de reprodução em ovinos.

**Palavras-chave:** Trealose. GnRH. Estradiol. Plasma seminal.

## ABSTRACT

CASALI, R. **Evaluation of methods of insemination, induction / synchronization of the follicular wave in ewes and additives in the freezing of ovine semen.** 2018. 81p. Doctoral Thesis in Animal Science. Area of concentration: Animal Production – Santa Catarina State University. Animal Science Postgraduate Program, Lages, 2018.

Sheep farming is economically stagnated by the lack of meat and milk production in a constant and standardized way. The difficulty to perform simplified transcervical AI, determined by tortuous cervix anatomy is one cause. This has determined that ovine frozen semen historically was conditioned to insemination by laparoscopy. This characterizes the need to search for alternatives that make possible the use of cervical AI. Also important is the definition of a protocol to synchronize the ovulation in ewes, facilitating the join of the gametes at the most appropriate time. Another important question to improve genetic advances in sheep farming is to increase the efficiency of ram semen cryopreservation. In order to overcome these obstacles, four studies were conducted. The first study compared the method of transcervical insemination with the superficial cervical insemination and laparoscopy methods. The second study evaluated the injection of 200 µg of estradiol benzoate (BE) at the start of a short-term synchronization protocol, using a third-use progesterone implant. In this study the use of GnRH (50 µg) was also evaluated at the time of insemination. The pregnancy diagnosis from studies 1 and 2 was performed 30 days after AI, by ultrasonography. The third study evaluated the follicular dynamics of ewes submitted to the same protocol of study 2, for a better understanding of the observed results. The study 4 evaluated the seminal quality of ovine semen frozen with the addition of trehalose or trehalose + equine seminal lyophilized plasma (PSLE) to the diluent. It was evaluated motility and vigor during the Thermal Resistant Test (TRT); membrane integrity by hyposmotic test; sperm migration after *swim up*, and sperm pathologies. The data were submitted to analysis of variance and, when necessary, to means comparison tests, with significance level of 5%. The results obtained in study 1 showed a higher pregnancy rate when the semen was deposited into the uterus, which was achieved in all females only by laparoscopy method. Transcervical insemination provides intermediate pregnancy rates (42.3%) between cervical insemination, and laparoscopy (36.0% and 50.2%, respectively P <0.05), being higher in ewes in which semen was deposited to a depth greater than 4 cm from the cervix (60.0% versus 35.1%). However, in transcervical method the intrauterine semen deposition was possible in less than 30% of the ewes. In addition, it is a more time consuming technique. Study 2 showed a higher pregnancy rate when BE was used at the start of short protocol (with BE = 46.4%, without BE = 40.4%). However, the use of GnRH as an ovulation inducer do not influenced pregnancy rates (with GnRH - 43.9% and without GnRH - 43%). The data from study 3 are being processed. Preliminary results show that mean diameter of the preovulatory follicles was 8.6 mm for group without BE and without GnRH; 7.7 mm for group without BE and with GnRH; 7.5 mm for group with BE and without GnRH and 7.3 mm for group with BE and with GnRH. In 12 out of the 40 ewes, estrus was observed during the protocol, and in 10 the estrus occurred within the first 48 hours after the BE application, indicating a probable side effect. The study 4 show that trehalose and the association of trehalose and PSLE improved motility and vigor (control = 36.5% / 3, trehalose + plasma = 42% / 3.3 and trehalose = 43.5% / 3.3); membrane integrity (control = 25.8%, trehalose + plasma = 38.6% and trehalose = 32.7%), as well as sperm migration after swim up.

The experiments carried out allowed us to contribute in questions to obtain adequate pregnancy rates in ewes. Finally, all the studies opportunized knowledge advances in factors that difficult the diffusion of ovine reproductive biotechnologies.

**Keywords:** Trehalose. GnRH. Estradiol. Seminal plasma.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figure 1 Transcervical insemination in the ewe. The female is placed with the hindquarters upward maintained on an easel, and with the aid of a duck-billed speculum and an external light source the cervix is located to be sprayed with 2% lidocaine hydrochloride. The instruments are showed in the upper panel (A). The entrance of the cervix is fixed cranial to the speculum by using a non-traumatic Allis forceps (B), to be clipped 0.5 to 1 cm laterally to the external os with two 26 cm Pozzi forceps for gently cervix traction and exteriorization (C). The cervix is positioned to enable complete manipulation directly with two fingers (e.g. thumb and index) for catheterization with a thin metal cannula of 2 mm diameter and blunt tip (D). After cannulation, 0.25 ml semen straw is discharged as deeper as possible into the cervix or directly into the uterus lumen (E)..... 36



## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 1**

Table 1	Pregnancy rate obtained with cervical, transcervical or intrauterine laparoscopic FTAI performed at 48 h (46 to 50 h) or 54 h (52 to 56 h) from progesterone intravaginal device removal.....	38
Table 2	Depth of semen deposition achieved with transcervical insemination and pregnancy rate obtained with fresh semen (100 x 106 sperm cells) after FTAI in multiparous Corriedale ewes.....	38

### **Capítulo 2**

Tabela 1	Percentual de prenhez obtida com protocolo curto (6 dias), empregando implantes de progesterona de terceiro uso, avaliando a aplicação ou não de BE no dia 0 e a aplicação ou não de GnRH no momento da inseminação, em ovelhas.....	50
----------	--	----

### **Capítulo 3**

Tabela 1	Percentual de motilidade progressiva e vigor (escala de 1-5) de sêmen ovino congelado em Tris gema glicerolado (Controle) e adicionado de Trealose + plasma seminal equino liofilizado (PSLE) ou Trealose. As avaliações foram realizadas logo após o descongelamento (Tempo zero) ou com 1, 2 e 3 horas do teste de termo resistência (TTR).....	66
Tabela 2	Percentual de células normais, viabilidade de membrana pelo teste hiposmótico, concentração de células recuperadas, percentual de motilidade e vigor (escala de 1-5), dos espermatozoides congelados sem aditivos (controle) ou com os aditivos tralose ou trealose + plasma seminal equino liofilizado (PSLE), avaliadas após o teste de <i>swim up</i> .....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BE</b>	Benzoato de Estradiol
<b>DICO</b>	Dispositivo intravaginal caprino ovino
<b>FIV</b>	Fecundação <i>in vitro</i>
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>IAC</b>	Integridade de Acrossoma
<b>IM</b>	Integridade de membrana
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>MAP</b>	Medroxiacetil progesterona
<b>MP</b>	Motilidade progressiva
<b>PIV</b>	Produção <i>in vitro</i>
<b>OS</b>	Plasma seminal
<b>PSLO</b>	Plasma seminal liofilizado ovino
<b>PSLB</b>	Plasma seminal liofilizado bovino
<b>PSLE</b>	Plasma seminal liofilizado equino
<b>TTR</b>	Teste de termo resistência



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1	MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS.....	23
2.2	SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM OVINOS.....	24
2.3	DANOS DECORRENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E ADITIVOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE CONGELAMENTO.....	26
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1 - SÊMEN DEPOSITION BY CERVICAL, TRANSCERVICAL AND INTRAUTERINE ROUTE FOR FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION (FTAI) IN THE EWE.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2 - UTILIZAÇÃO DO BE E GNRH EM PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO CURTO DE OVELHAS, UTILIZANDO IMPLANTES DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA.....</b>	<b>45</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	47
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 3 – DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS CRUZA CORRIEDALE X MERINO, UTILIZANDO BE NO DIA 0 E GNRH COMO INDUTOR DA OVULAÇÃO, EM PROTOCOLO CURTO COM IMPLANTE DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA (TERCEIRO USO).....</b>	<b>55</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	55
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
5.3	RESULTADOS OBTIDOS.....	57
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 4 - USO DE TREALOSE E PLASMA SEMINAL LIOFILIZADO EQUINO NO PRÉ CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO.....</b>	<b>59</b>

6.1	INTRODUÇÃO.....	62
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
6.2.1	Obtenção do plasma seminal.....	64
6.2.2	Obtenção e processamento do sêmen.....	64
6.2.3	Avaliações pós descongelamento.....	65
6.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
6.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
7	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75

## 1 INTRODUÇÃO

No aspecto econômico, a ovinocultura encontra-se estagnada em função da ausência de uma escala de produção competitiva, que mantenha constante e padronizado o fornecimento de carne e leite. No estado de Santa Catarina a situação é ainda agravada pela dificuldade de intercâmbio genético, em função de ser área livre de febre aftosa e possuir uma regulamentação rígida no trânsito de animais.

Na ovinocultura, a reprodução é realizada predominantemente com o uso de monta natural ou IA por via cervical, com sêmen fresco. Isto determina que os carneiros padreadores sejam oriundos apenas da própria região. Em função da anatomia tortuosa da cérvix ovina, da dificuldade com a sincronização da ovulação na ovelha e da baixa qualidade do sêmen ovino após descongelamento, a inseminação cervical com sêmen congelado apresenta resultados pobres e inconsistentes (EL-HAJJ GHAOUI et al., 2007; O'MEARA et al., 2007).

Estas limitações determinaram que historicamente o emprego de sêmen ovino congelado esteja condicionado ao método de inseminação intrauterina por laparoscopia (SALAMON; MAXWELL, 1995). Todavia, o custo do equipamento, as condições necessárias de infraestrutura e principalmente a necessidade de profissionais especializados, dificultam a difusão da técnica (KERSHAW et al., 2005). Isto caracteriza a necessidade de se buscar alternativas que proporcionem melhorar a taxa de prenhez na IA. Alternativas como metodologias práticas de IA que possibilitem a deposição intrauterina do sêmen, uma melhor sincronização da ovulação e a melhora da qualidade do sêmen ovino congelado, podem possibilitar o intercâmbio e a disseminação de material genético de elevado padrão zootécnico.

Richardson et al. (2012) encontraram correlação positiva entre a profundidade da deposição do sêmen na cervix e a taxa de prenhez. O método de inseminação transcervical já vem sendo testado em ovelhas, porém com número reduzido de animais e sem comparação concomitante das três técnicas (RABASSA et al., 2007; WULSTER-RADCLIFFE et al., 2002; BARTELEWSKI et al, 2016). Casali et al. (2016) obtiveram taxa de prenhez de 68,7% para IA transcervical com sêmen fresco, em relação a prenhez com IA cervical (47%), reforçando a necessidade de um aprofundamento nestas avaliações. Torna-se interessante a comparação da técnica transcervical com as outras já comumente utilizadas (via cervical e laparoscopia) em programas de IATF em larga escala para avaliar a viabilidade de sua aplicação.

Não menos importante é a definição de um protocolo de sincronização que possibilite concentrar o momento da ovulação em ovelhas, possibilitando assim que o encontro de gametas seja oportunizado no momento mais adequado. Com o domínio da técnica de avaliação da dinâmica folicular em ovinos, através do mapeamento ovariano por ultrassonografia, se tornou possível adquirir conhecimentos mais concretos sobre o funcionamento da dinâmica ovariana, em cada situação (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Com a ultrassonografia torna-se possível o acompanhamento dos momentos de emergência de onda, crescimento folicular e ovulação, diferente de trabalhos anteriores que realizavam avaliações de ovário empregando a laparoscopia ou laparotomia, em momentos pontuais (BOSCOS et al., 2002).

O impacto da reutilização de implantes de progesterona vem sendo estudado em cabras (VILARIÑO et al., 2011) e ovelhas (VILARIÑO et al., 2013), sendo observado que no terceiro uso do implante, a progesterona não é suficiente para que todas as ovelhas tenham a emergência de uma nova onda folicular, o que prejudica a taxa de prenhez (VILARIÑO et al., 2013). O uso de benzoato de estradiol (BE) pode ser uma alternativa para regressão do folículo dominante e emergência de uma nova onda folicular em ovinos (MEIKLE et al., 2001). De forma semelhante, o GnRH pode ser empregado como indutor de ovulação, buscando a sua sincronização, ou ovulação de um folículo persistente (PIERSON et al., 2003). Estas alternativas podem ser interessantes para incrementar a taxa de prenhez na IATF em ovinos.

O terceiro e também importante quesito para possibilitar o avanço do melhoramento genético dos ovinos, preconiza o aumento da eficiência da criopreservação do sêmen. Sabe-se que a viabilidade do sêmen ovino é diminuída durante o processo de congelação. Lesões ultraestruturais, bioquímicas e funcionais, causadas pelos processos de congelação e descongelamento, promovem a redução da motilidade e do transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (SALOMON; MAXWELL, 1995). O plasma seminal contém proteínas que previnem essas lesões, aumentando a longevidade do sêmen ovino congelado (MAXWELL et al., 2007).

O uso de PS homólogo, apresentou resultados satisfatórios ao incrementar a sobrevivência de espermatozoides ovinos (LÓPEZ-PÉREZ; PÉREZ-CLARIGET, 2012). Porém, limitações como o baixo volume do ejaculado ovino e o aumento no volume da dose inseminante, com a consequente redução da concentração, limitam o emprego do plasma seminal. Casali et al. (2014) demonstra que as restrições no uso do PS ovino, como os riscos sanitários e o pequeno volume

obtido, podem ser superados pelo uso de PS liofilizado equino (PSLE), que proporcionam incremento na motilidade e na taxa de clivagem, após FIV heteróloga.

Outra alternativa para melhorar a congelandabilidade do sêmen é o uso de açucares no meio de congelamento. A trealose, um dissacárido que não permeia a célula, interage com os fosfolipídios e proteínas da membrana, aumentando sua flexibilidade e prevenindo criolesões (AISEN et al., 2002; BUCAK et al., 2007). Chillar et al. (2012), observaram que a adição de trealose ao diluente melhora a qualidade espermática de sêmen bovino após o descongelamento, reduzindo o percentual de espermatozoides criocapacitados, assim como a peroxidação lipídica. Tanto o PS, como a trealose constituem potenciais candidatos para melhorar a criotolerância do sêmen ovino, sendo necessária a avaliação desses efeitos, assim como a associação dos mesmos.

É possível que a adoção da inseminação intrauterina, o emprego de um protocolo que sincronize a ovulação das ovelhas e a melhora na viabilidade do sêmen congelado, resultem no aumento na taxa de prenhez em programas de IA em ovinos.

Este trabalho foi composto por quatro estudos, sendo que o primeiro comparou a taxa de prenhez obtida nas técnicas de inseminação transcervical, cervical superficial e inseminação por laparoscopia. O segundo estudo buscou avaliar a sincronização do cio através da utilização de BE no início de um protocolo curto e de indutor de ovulação ao final do mesmo, com emprego de implante com baixa concentração de progesterona (terceiro uso). O terceiro estudo buscou avaliar a dinâmica folicular, através de ultrassonografia em ovelhas Corriedale, submetidas aos mesmos tratamentos do segundo estudo, buscando o entendimento dos resultados observados no estudo anterior. No quarto estudo buscou-se a melhora da criotolerância do sêmen ovino pela adição de trealose e da associação trealose + PSLE ao diluente de congelamento.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS

Na espécie ovina é possível realizar quatro metodologias para inseminação: vaginal, intracervical, transcervical e por laparoscopia. As duas primeiras só apresentam taxas de prenhez aceitáveis com o emprego de sêmen fresco ou refrigerado (CSEH et al., 2012). Isto ocorre pela dificuldade de migração espermática causada por alterações decorrentes da criopreservação, associado a condição anatômica da cérvix ovina. Richardson et al. (2012) não encontraram diferença em taxas de prenhez no uso de inseminação vaginal versus cervical, porém encontraram correlação positiva da profundidade de penetração cervical com as taxas de prenhez, instigando novas investigações.

O local da inseminação tem um efeito importante sobre a prenhez, com maiores taxas obtidas após inseminação por laparoscopia ou transcervical (WULSTER-RADCLIFFE et al., 2004). A única metodologia aplicada com sêmen congelado em grande escala é a via laparoscópica (HALBERT et al., 1990). A técnica transcervical vem sendo aplicada com sucesso em algumas raças, inclusive possibilitando coleta e transferência de embriões, porém em pequena escala (FONSECA et al., 2013; FONSECA et al., 2016).

A técnica transcervical é limitada devido à disposição dos anéis do colo cervical ovino, o qual geralmente impossibilita a passagem da pipeta de IA para o corpo do útero (EVANS et al., 1987), limitando a difusão da técnica de IA e transferência de embriões, por esta via (AUDICANA et al., 1998). O colo do útero ovino é um órgão tubular longo, fibroso composto predominantemente de tecido conjuntivo com uma camada serosa exterior e epitélio luminal interior. O lúmen é altamente tortuoso, devido à presença de 4 a 7 anéis cervicais (FUKUI; ROBERTS, 1978).

Segundo Wulster-Radcliffe et al. (2004), existem dois evidentes métodos para driblar as características físicas da cérvix ovina; alinhar a cérvix e aumentar o diâmetro do lúmen, ou projetar um aplicador que acompanhe essa tortuosidade. Kershaw et al. (2005) relata ser promissor o desenvolvimento de pipetas de IA que superem o lúmen cervical permitindo penetração, o que aumentaria taxas de prenhez com sêmen congelado, na inseminação por via cervical. Wulster-Radcliffe et al. (2004) criaram um cateter que permitia uma deposição à frente do sítio de deposição cervical, porém não observaram melhora nas taxas de prenhez com esse método. Alvarez et al.

(2012) testando 4 diferentes cateteres, concluiram que o uso de um cateter CAT06 (com 0,6 centímetros da parte distal curvas com um ângulo de 30º) possibilita uma maior penetração do colo do útero, com melhora na fertilidade de ovelhas Churra e Assaf, após a inseminação.

Com sêmen congelado, o sucesso da IA depende da disponibilidade de uma técnica de inseminação barata e eficaz (RICHARDSON et al., 2012). Estudos tem avaliado a técnica de inseminação transcervical, porém com reduzido número de animais e comparando apenas uma das técnicas de inseminação – cervical ou laparoscopia (RABASSA et al., 2007; WULSTER-RADCLIFFE et al., 2002; BARTELEWSKI et al., 2016). Recentemente, a técnica de inseminação transcervical vem sendo aprimorada no Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem, com taxas de prenhez satisfatórias, em comparação com a IA cervical. Em ovelhas Lacaune obteve-se 47% de prenhez para IA cervical e 68,7% para IA transcervical, realizada 12h após a observação do cio com sêmen resfriado (CASALI et al., 2016).

## 2.2 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

A técnica de sincronização mais utilizada em ovelhas é baseada no uso de progestágeno intravaginal por um período de 12-14 dias, seguida de administração de eCG (MARTEMUCCI; ALESSANDRO, 2010). As doses de eCG foram ajustadas por Boland et al. (1981) de 250 a 750 UI conforme a idade, a estação e a raça. Este tradicional protocolo foi proposto antes de 1990, quando não havia ainda o conhecimento da dinâmica folicular de pequenos ruminantes (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Desde então, os protocolos vêm sendo ajustados em razão dos novos conhecimentos e dos problemas identificados.

Em virtude da praticidade de aplicação, os implantes intravaginais são os mais comumente utilizados, sendo eles o CIDR e esponja impregnada de acetato medroxiprogesterona. Outra alternativa avaliada por Martins et al. (2010) são os absorventes higiênicos de uso intravaginal humano, impregnados com acetato de medroxiprogesterona, os quais mostraram-se higiênicos, práticos e de menor custo. O Dispositivo Intravaginal Caprino e Ovino (DICO®), 0,3g de progesterona vem sendo estudado principalmente em relação a reutilização em protocolos curtos para um melhor custo benefício do implante (VILARIÓO et al., 2010). A taxa de prenhez é afetada pelo implante de progesterona utilizado (CIDR-G: 55,8%, DICO: 55,7%, MAP esponjas: 37,4%) sendo CIDR® e DICO® semelhantes e superiores a esponjas (SANTOS NETO et al., 2015).

Em ovelhas de corte, Vinoles et al. (1999) e Ungerfeld e Rubianes (1999) encontraram melhora significativa nas taxas de prenhez quando empregaram o protocolo por 6 dias versus 12 dias de progestágenos. Quando se utiliza o protocolo curto na estação de monta, torna-se necessária a aplicação de prostaglandina, em função da possibilidade de existir um corpo lúteo da ovulação anterior. Rubianes e Menchaca (2003) relataram que o período refratário a prostaglandina em ovinos é 2 dias após ovulação.

Em ovelhas, um prolongado tratamento com progestágenos geralmente é associado a baixas taxas de concepção (VIÑOLES et al., 2001) e variáveis taxas de fertilidade (GORDON 1983; MENCHACA; RUBIANES, 2004), por induzirem a ovulação de folículos velhos (VIÑOLES et al., 2001), além de um alto índice de vaginites.

O estudo da reutilização de implante CIDR-G, que foi desenvolvido para protocolo longo em pequenos ruminantes, demonstrou que a concentração sérica de progesterona apresentava-se diferente principalmente durante as primeiras 24h da aplicação do implante de primeiro uso, em relação ao segundo e terceiro uso. O pessário de primeiro uso promoveu o *turn over* em 100% dos animais e o folículo ovulatório foi de uma nova onda folicular, ao contrário dos de segundo e terceiro uso (80%). O estro foi sincronizado por volta de 30h e a ovulação entre 60-70h da remoção do dispositivo, não apresentando diferença entre os usos provavelmente devido ao número de animais testados. Porém a taxa de prenhez foi inferior quando utilizado o implante de terceiro uso, possivelmente pelo reduzido nível de progesterona que não promoveu a emergência de uma nova onda folicular (VILARIÑO et al., 2011).

Em um estudo com a reutilização do DICO, a porcentagem de ovelhas que ovulam um folículo de uma nova onda com dispositivo de primeiro uso foi de 100% (10/10), já no segundo e terceiro uso foi de apenas 77,8% (7/9) e 80% (8/10) dos animais. O atenuado aumento na progesterona com dispositivos reutilizados pode ter induzido folículos pre-ovulatórios persistentes, afetado o surgimento de uma nova onda folicular. Há uma tendência de os implantes de terceiro uso proporcionarem uma taxa de prenhez 10% menor que os implantes novos ( $P >0,06$ ) (VILARINO et al., 2013). Vilariño et al. (2013) demonstraram que, com os implantes de terceiro uso, o nível de progesterona sérica foi menor no decorrer do protocolo.

Baixos níveis de progesterona sérica aumentam a frequência de pulsos de LH, que por sua vez aumenta o tamanho do folículo maior e realiza o *feedback* positivo do estradiol com o eixo GnRH e LH. Já concentrações sub-luteais de progesterona aumentam os pulsos LH, mas não o

suficiente para que o pico ocorra, determinando a persistência do folículo e prolongando a dominância (MENCHACA; RUBIANES, 2004).

Em ovelhas, foram demonstrados efeitos semelhantes aos bovinos quando administrado estradiol-17  $\beta$ , com regressão do folículo dominante e emergência de uma nova onda folicular 3 dias mais tarde (MEIKLE et al., 2001). BARRETT et al. (2008) confirmaram este efeito do estradiol-17  $\beta$  (E2) em ovelhas em anestro e observaram que a associação do E2 ao progestágeno (MAP), com a aplicação de eCG no final do protocolo, não só promove a emergência e sincronia da onda de crescimento folicular, como melhora a sincronização das ovulações. A aplicação de BE se mostra como alternativa para possibilitar um melhor aproveitamento de implantes multiusos, mantendo as taxas de prenhez, até o terceiro uso.

Uma alternativa testada em outras espécies é o uso de indutores de ovulação. Em cabras, Pierson (2003) demonstrou a possibilidade de induzir o pico de LH, com a aplicação de GnRH 24h após a retirada do pessário e aplicação do eCG. O estradiol também demonstrou ser um potencial indutor de ovulação em cabras, quando aplicado no mesmo período (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Em ovinos o aumento na concentração sérica de progesterona foi observado no grupo onde foi aplicado GnRH como indutor de ovulação (BISCARTE et al., 2012). Em protocolos curtos para ovinos, esses indutores ainda não foram avaliados, o que motiva a condução de novas investigações.

### 2.3 DANOS DECORRENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E ADITIVOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE CONGELAMENTO

Um fator limitante para o aumento e a constância da produção ovina, pode ser atribuído à baixa fertilidade do sêmen congelado, o que dificulta a introdução de variabilidade genética nos rebanhos (WATSON, 2000). Estudos *in vivo* demonstraram que no sêmen ovino criopreservado o tempo de manutenção da viabilidade espermática é três vezes menor do que no sêmen fresco (LOPYRIN, 1971). Portanto, é necessário o uso de estratégias que prolonguem a viabilidade do sêmen congelado, otimizem o transporte espermático no trato genital da fêmea e tenha como consequência um aumento nas taxas de prenhez.

As células espermáticas contêm alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados, que são particularmente susceptíveis aos danos oxidativos, especialmente após a criopreservação. Isto

determina a subsequente perda na integridade de membrana, o que compromete a função celular e diminui a motilidade e a capacidade fecundante. A composição lipídica da membrana do espermatozoide é o maior determinante de sua viabilidade (BUCAK et al., 2008). Lesões ultra estruturais, bioquímicas e funcionais, causadas pelos processos de congelamento e descongelamento, promovem a redução da motilidade e do transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (SALOMON; MAXWELL, 1995).

A criolesão espermática promove a prematura indução de um estado semelhante à capacitação, a chamada criocapacitação (BAILEY et al., 2000). A capacitação prematura do espermatozoide altera sua motilidade, viabilidade e posteriormente a sua longevidade (GILLAN; MAXWELL, 1999), resultando em redução nas taxas de prenhez com o sêmen congelado, em comparação com sêmen fresco.

Com o passar dos anos, os diluentes foram sendo modificados e adaptados. De formulações simples, baseadas em citrato ou leite, associados a açúcares monossacarídeos, houve a introdução dos di e tri sacarídeos, o uso de tamponantes orgânicos como o TRIS, agentes crioprotetores como gema de ovo, glicerol entre outros (SALAMON; MAXWELL, 1995). Nesse sentido, diversos aditivos têm sido utilizados visando prevenir, ou reduzir os danos causados durante as diferentes fases do processamento do sêmen, seja na diluição, resfriamento, congelamento ou reaquecimento.

O plasma seminal (PS) de mamíferos é uma secreção fisiológica produzida a partir das glândulas anexas ao trato reprodutivo do macho (EL-HAJJ GHAOUI et al., 2006). Nas diferentes espécies o PS contém fatores que podem influenciar a viabilidade espermática, afetando a motilidade e a sobrevivência no pós-descongelamento (GRAHAM, 1994; MAXWELL et al., 1997). O uso de PS homólogo, apresentou resultados satisfatórios por sua atuação em diferentes mecanismos de preservação da sobrevivência de espermatozoides ovinos *in vitro* (MAXWELL; WATSON, 1996; BALERCIA et al, 2003; BARRIOS et al, 2000) e *in vivo* (LÓPEZ-PÉREZ; PÉREZ-CLARIGET, 2012). O PS contém proteínas que previnem a capacitação, o que aumenta a longevidade do sêmen ovino congelado (MAXWELL et al., 2007).

Maxwell e Evans (1999) examinaram o efeito da re-suspensão de espermatozoides de carneiro em 20-30% de PS após o descongelamento, comprovando a melhoria da penetração dos espermatozoides através do muco cervical e aumentando a fertilidade depois da IA cervical. Mortimer e Maxwell (2004) relatam que espermatozoides descongelados re-suspensidos em PS

artificial ou PS ovino, melhoraram o movimento e aumentaram a estabilidade de membrana, quando comparados a aqueles re-suspendidos em PBS, sugerindo que isto foi devido aos componentes presentes no PS. Já O'Meira et al. (2007) observaram diferenças na fertilidade entre carneiros (17,7 vs 45,2%) após a IA cervical de ovelhas com sêmen descongelado, o que foi atribuído a diferenças nos componentes do PS entre os machos.

A adição de PS ao sêmen descongelado melhora a motilidade, a viabilidade, a integridade de acrosoma e a respiração mitocôndria. Estes efeitos benéficos foram atribuídos as proteínas do plasma, especialmente RSVP14 e RSVP20 (BARRIOS et al., 2005). Estas proteínas possuem capacidade antioxidante (MARTI et al., 2007), efeito que está relacionado a proteção contra o estresse oxidativo e a capacitação prematura do espermatozoide (MUIÑO-BLANCO et al., 2008). Maxwell et al. (1999) demonstraram benefício na qualidade espermática *in vitro*, assim como na fertilidade após inseminação cervical com sêmen ovino congelado, adicionado de PS, contrapondo parcialmente os dados de Leahy et al. (2010), que observaram a melhora apenas *in vitro*.

Proteínas do PS bovino também interagem com fosfolipídeos na membrana plasmática da célula espermática e participam na desestabilização (capacitação) e estabilização (decapacitação) da membrana do espermatozoide (THERIEN et al., 2005). Estes achados são consistentes com a idéia de que o efeito do PS está associado com a presença de uma capa de componentes que mantém a estabilidade de membrana até o processo de capacitação, os chamados fatores decapacitantes (MUIÑO-BLANCO et al., 2008; VADNAIS; ROBERTS, 2007). No PS de bovinos, um grupo de proteínas chamadas BSP, quando associadas à superfície das células, modulam a capacitação espermática. Proteínas homólogas foram reportadas em garanhões (MENARD et al., 2003) e em ovinos (JOBIM et al., 2005).

Assim, uma alternativa viável seria o emprego de PS no meio de congelamento. Porém, limitações como o baixo volume do ejaculado ovino e o aumento no volume da dose inseminante, com a consequente redução da concentração, limitam o emprego do plasma seminal. Para driblar estes entraves, Martins et al. (2013) demonstraram a viabilidade do uso de PS de espécies com maior volume de ejaculado, como os equinos. Os autores demonstraram o efeito positivo da adição de PS heterólogo, após o descongelamento do semen ovino, reduzindo as restrições dos riscos sanitários e do pequeno volume obtido. No entanto, o uso de plasma seminal ainda era limitado pelo aumento do volume da dose inseminante. Casali et al. (2014) demonstraram que estes entraves

podem ser superados pelo uso de PS liofilizado equino (PSLE), que proporcionaram incremento na motilidade e na taxa de clivagem, após FIV heteróloga com oócitos bovinos.

Atualmente, o conhecimento disponível sobre os efeitos do PS em espermatozoides e a fertilidade, parece disperso e muitas vezes conflitante. Isto pode ser visto como um forte motivador para novas pesquisas nesta área (KARESKOSKI et al., 2008).

A trealose, um dissacarídeo que não permeia a célula, tem uma ação protetora, relacionada tanto ao efeito osmótico, quanto a interações específicas com fosfolipídios de membrana. A trealose torna o meio hipertônico, causando desidratação osmótica celular antes do congelamento e diminuindo as lesões celulares, por cristalização de gelo (STOREY et al., 1998; LIU et al., 1998).

A suplementação de trealose ao diluente Tris-gema citrato, antes da criopreservação, melhora a qualidade espermática bovina, aumentando a motilidade, a viabilidade e a integridade da membrana de espermatozoides e reduzindo o percentual de espermatozoides criocapacitados, a peroxidação lipídica e a presença de cálcio intracelular (CHILLAR et al., 2012).

A trealose tem a capacidade de estabilizar as membranas e diferentes autores demonstraram sua efetividade durante a criopreservação. Em caprinos a combinação de monossacarídeos (glicose) e dissacarídeo (trealose) melhorou a motilidade total, motilidade progressiva, espermatozoides vivos, integridade do acrosoma e integridade da membrana após a criopreservação do sêmen (NAING et al., 2010). Em javalis além de a trealose aumentar a viabilidade espermática, incrementou a taxa de penetração espermática e produção de blastocistos (MALO et al., 2010).

Em ovinos a adição de 76 g/L trealose produzem uma redução no estresse oxidativo provocado pelo processo de congelamento e descongelamento (AINSEN et al., 2005). Bucak et al. (2007) demonstraram que a suplementação de trealose em diluentes de sêmen, melhora a viabilidade e a motilidade do sêmen ovino refrigerado ou criopreservado. O sêmen ovino criopreservado e diluído em diluente contendo trealose, possibilitou 45 a 47% de parição após inseminação cervical em dois ensaios consecutivos, o que foi 2,5 vezes maior do que a taxa de fertilidade obtida com o diluente controle (AINSEN et al., 2002).

Desta forma, a associação de PS equino liofilizado com a trealose podem potencializar a criotolerância de espermatozoides ovinos e possibilitar o emprego de sêmen congelado na inseminação em ovelhas.



### 3 CAPÍTULO 1

Este capítulo apresenta o artigo publicado no periódico Theriogenology na íntegra.

CASALI, R. et al. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*, v. 103, p. 30–35, nov. 2017.

#### ABSTRACT

Semen deposition through the cervix into the uterus is a difficult technique in ewes and represents the main limiting factor for insemination in this species. The objective of this study was to evaluate the pregnancy rate achieved with a new transcervical insemination method in comparison with conventional cervical and laparoscopic intrauterine techniques. A total of 586 multiparous Corriedale ewes were synchronized for fixed time artificial insemination (FTAI) performed by cervical, transcervical, or intrauterine route at 46-50 h or 52-56 h after progesterone device removal in a 3 x 2 factorial design. Pregnancy rate was affected by the insemination technique and by the moment of FTAI ( $P < 0.05$ ), without interaction ( $P = \text{NS}$ ). Overall, the fertility was improved as semen deposition was deeper and insemination was delayed. For transcervical insemination, pregnancy rate was intermediate (42.3%;  $P = \text{NS}$ ) between cervical and intrauterine route (36.0% and 50.2%;  $P < 0.05$ ), and was greater for those ewes inseminated beyond 4 cm into the cervix (60.0% versus 35.1% for insemination beyond or within 4 cm into the cervix, respectively;  $P < 0.05$ ). Semen deposition beyond 4 cm into the cervix was achieved only in 28.8% of the females receiving transcervical insemination. This method was more time-consuming than cervical or laparoscopic insemination (11.4  $\pm$  1.6 versus 85.5  $\pm$  7.5 and 56.8  $\pm$  5.6 ewes inseminated per hour, respectively;  $P < 0.05$ ). In summary, greater pregnancy rate using FTAI is obtained when semen is placed into the uterus, which was achieved in all females only through laparoscopy. Further improvements are required for transcervical insemination to be applied in large-scale FTAI programs in Corriedale ewes.

**Keywords:** Sheep. Intracervical. Sperm. Estrus. Synchronization.

## 1. Introduction

Artificial insemination is a high-impact technology in ruminant industry because it increases genetic improvement, makes easier the international trade of males and the conservation of genetic resources, allows a better control of reproduction, and contributes with animal health by controlling several infectious diseases. In addition, the possibility to perform fixed time artificial insemination (FTAI; i.e. without estrous detection) further promotes the use of this tool by technicians and farmers making its implementation much easier (see review in sheep and goats: Menchaca and Rubianes [1]; cattle: Bó et al. [2]). In ewes, unlike cows, the main limiting factor for insemination is the difficulty to go through the cervix with the insemination pipette for intrauterine semen deposition. The cervix of the ewe is a small, narrow, rigid and tortuous structure that makes difficult cannulation and deposition of semen into the uterus [3] [4]. For this reason, usually semen is located in the entrance of the cervix through the vagina canal (cervical insemination) or injected into the uterine lumen through the uterine wall by laparoscopy (laparoscopic insemination).

The intrauterine insemination assisted by laparoscopy is an effective technique adapted for sheep in the 1980s [5]. This is the preferred technique mainly when frozen semen is used, since normally fertility of cryopreserved sperm by cervical insemination is extremely poor [6]. In addition, intrauterine insemination induces greater pregnancy rate than cervical insemination also with fresh semen [7]. For this reason, intrauterine insemination at prefixed time performed by laparoscopy is used in large-scale programs in several countries. However, although laparoscopy is a minimally invasive procedure, it requires veterinary expertise, implies animal welfare concerns, and is more demanding in terms of equipment and labor than cervical insemination. Even though several alternative approaches have been proposed to replace the use of laparoscopy, this technique continues being the default method when obtaining greater pregnancy rate is mandatory.

Transcervical insemination technique to perform intrauterine semen deposition through the cervix is not an usual practice in sheep. In the 1970s, Fukui and Roberts [8] described a method consisting of the fixation of the cervix with long forceps and a ball-tipped 17-gauge hypodermic needle attached to an inseminating pipette. This was introduced through the external os into the cervical canal. Some years later, in the 1990s Halbert et al. [9] evaluated four methods of restraint, four vaginal specula, three forceps and four instruments for transcervical passage, and developed a method that they named the Guelph System, which was later assessed in terms of lambing rate

with variable success [10]. Different approaches, techniques, devices and drugs have been proposed by several authors in diverse conditions to improve the passage of the ovine cervix [11] [12] [13] [14]. The fertility outcomes are contradictory among reports, varying from 0% [15] to 70% [16] of pregnancy rate, and some of them are presented as proof of concept that sometimes are not followed by validation or field trials with enough number of females, breeds and ages. Recently, promissory outcomes have been reported with a novel transcervical approach for uterine flushing and embryo transfer in sheep and goats [17][18]. This technique consist in the traction and fixation of the cervix through the vagina and catheterization assisted by rectal or vaginal manipulation using one or two fingers. Although this technique has been reported for insemination in sheep, little information is available with its use in comparison with conventional cervical or laparoscopic insemination. In addition, information with this technique is even scarce associated with FTAI, and several factors such as time of insemination, dose of sperm required, and time consuming during procedure should be defined.

The objective of this study was to evaluate pregnancy outcomes obtained with insemination by transcervical technique compared with conventional cervical insemination and intrauterine insemination by laparoscopy, evaluating the feasibility to apply this method in large-scale FTAI programs in sheep.

## 2 Material and Methods

### Animals and treatments for FTAI

The study was conducted during the breeding season in Uruguay (May, 33° S) and all the procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of IRAUy certified by the National Council of Animal Care of Uruguay. A total of 586 multiparous Corriedale ewes with a body condition score of  $3.0 \pm 0.1$  (Mean  $\pm$  SEM; scale 0–5) [19] were synchronized in two consecutive days to receive FTAI after a short-term progesterone protocol described by Menchaca and Rubianes [1]. The treatment for FTAI consisted of the insertion (Day 0) of an intravaginal silicone device (0.3 g progesterone, DICO®, Syntex, Bs As, Argentina), and one dose of eCG (300 IU, Novormon, Syntex) and prostaglandin F2alpha analog (125 µg sodium cloprostenol, Ciclase DL, Syntex) given im on Day 6 in the morning at device removal. The DICO® devices

had been previously validated for sheep with similar pharmacokinetics and pharmacodynamics [20] and fertility [7] than CIDR-G® devices. The ewes were exposed to androgenized Corriedale wethers from device removal to insemination in a 10:1 females: male ratio. The wethers were previously treated with testosterone (200 µg of testosterone propionate, Dispert, Montevideo, Uruguay) given twice 7 d apart with the second dose administrated at time of DICO removal in the females. The females were randomly assigned to one of three insemination techniques by cervical, transcervical, or intrauterine route by laparoscopy. The FTAI was performed for each technique in the morning or in the afternoon of Day 8 (i.e. 46 to 50 h and 52 to 56 h after device removal) in a 3x2 factorial design. Fresh semen was collected by artificial vagina from four Awassi rams and only those ejaculates within acceptable parameters regarding volume (0.75–2 ml), sperm concentration ( $>3 \times 10^9$  spermatozoa/ml), and sperm motility ( $>70\%$  motile cells) were used. The sperm concentration was determined with a spectrophotometer (SDM1, Mintüb, Tiefenbach, Germany) and after evaluation semen was diluted in skim UHT milk and used in pools from all the rams (one ejaculated per ram) to prevent individual effect of the rams on fertility. Each pool of semen was divided in three aliquots to be used for cervical, transcervical or intrauterine FTAI, and the dilution rate was adjusted to use  $150 \times 10^6$  spermatozoa in 0.1 ml,  $100 \times 10^6$  spermatozoa in 0.2 ml, or  $75 \times 10^6$  spermatozoa in 0.2 ml per ewe, respectively. The dilution rate was established according the sperm concentrations usually reported for these techniques [21], regarding the well-known concept of as deeper the insemination site is, the sperm concentration required is lower. Diluted semen was maintained at 30° C and the ewes were inseminated within one hour from semen collection (i.e. the three techniques simultaneously). After this period, the remaining semen was discharged and collected again for a new insemination session. Pregnancy rate was determined by transrectal ultrasonography using a 5.0 MHz transducer (Aloka 500SSD, Tokyo, Japan) 30–31 days after insemination.

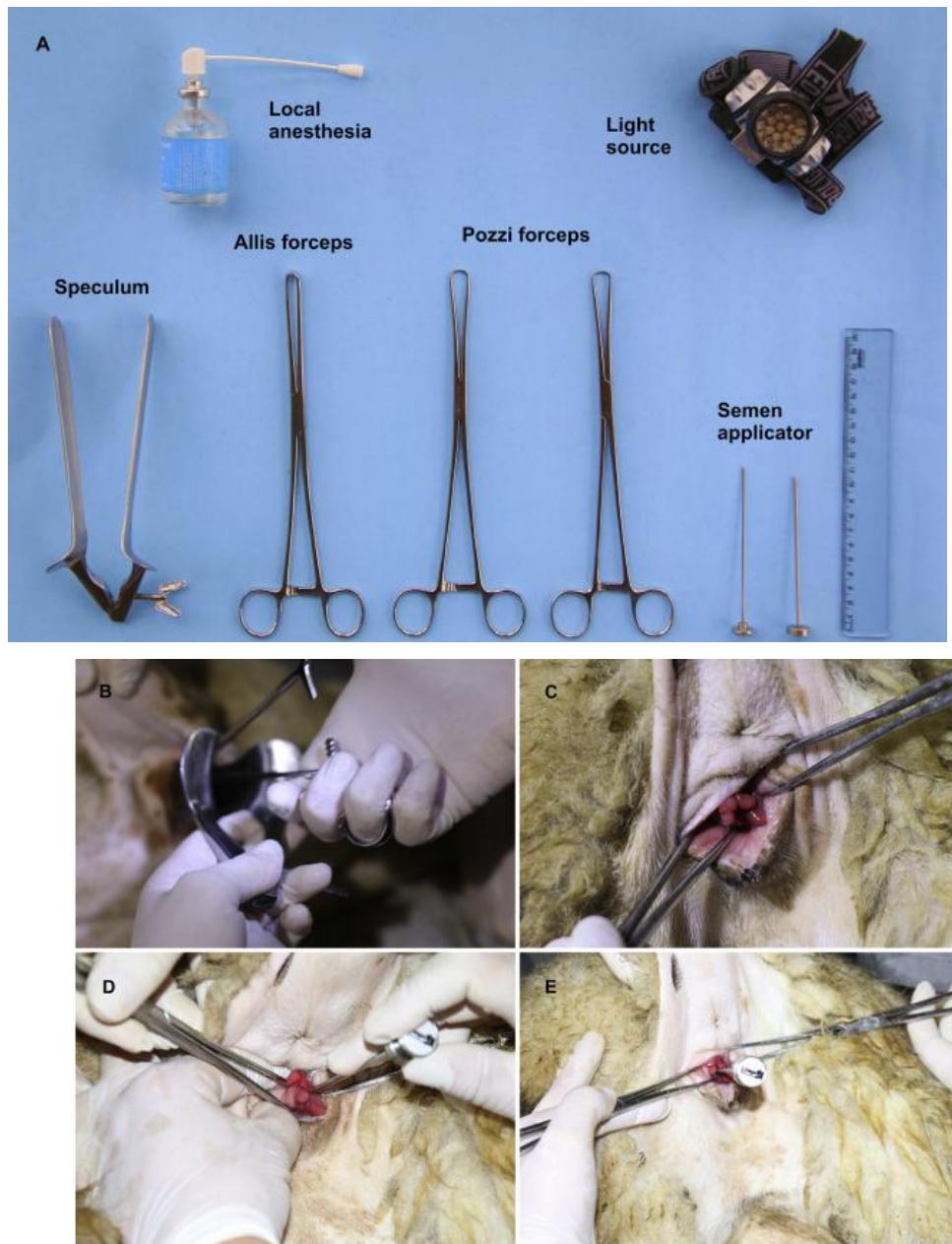
#### Insemination techniques and semen deposition

Cervical, transcervical and intrauterine laparoscopic insemination was performed by three veterinarians with enough experience using each technique in large-scale FTAI programs. The three techniques were conducted at the same time in three insemination stations mounted for cervical, transcervical and intrauterine insemination.

For cervical insemination (n= 239), the females were restrained with the hindquarter upwards on the railing fence panel as performed routinely. The insemination was done using a vaginoscope with light source incorporated and a multidose insemination gun (Walmur, Montevideo, Uruguay) that allow semen deposition at the end of the vagina in the external os of the cervix.

For transcervical insemination (n= 104; Figure 1), the females were placed with the hindquarters upward maintained on an easel, and with the aid of a duck-billed speculum and external light source, the cervix was located to be sprayed with 2% lidocaine hydrochloride. After that, the cervix was fixed outside the speculum by using a non-traumatic Allis forceps, and then, clipped 0.5 to 1 cm laterally to the external os with two 26 cm Pozzi forceps [18]. Cervical traction was performed gently and the cervix was positioned to enable complete manipulation directly with the fingers. The cervix catheterization was performed with a thin metal cannula of 2 mm in diameter (Wago, SP, Brazil) designed for containing a 0.25 ml semen straw, which was threading by external manipulation with two fingers (i.e. thumb and index). After semen discharge, the deep of penetration was measured in the cannula. The transcervical technique is depicted in Figure 1.

Figure 1. Transcervical insemination in the ewe. The female is placed with the hindquarters upward maintained on an easel, and with the aid of a duck-billed speculum and an external light source the cervix is located to be sprayed with 2% lidocaine hydrochloride. The instruments are showed in the upper panel (A). The entrance of the cervix is fixed cranial to the speculum by using a non-traumatic Allis forceps (B), to be clipped 0.5 to 1 cm laterally to the external os with two 26 cm Pozzi forceps for gently cervix traction and exteriorization (C). The cervix is positioned to enable complete manipulation directly with two fingers (e.g. thumb and index) for catheterization with a thin metal cannula of 2 mm diameter and blunt tip (D). After cannulation, 0.25 ml semen straw is discharged as deeper as possible into the cervix or directly into the uterus lumen (E).



Intrauterine insemination ( $n= 243$ ) was performed by laparoscopy (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). All ewes were fasted and had restricted access to water for 12 hours before the procedure. For insemination, the females were restrained in cradles with the rear legs lifted to an approximate 40-45 degree angle. The trocar and cannula were inserted into the peritoneal cavity to the left and right of the middle line, approximately 5 cm cranial to the udder. The peritoneal cavity was inflated with carbon dioxide to help visualize the uterus with the aid of the laparoscope and separate it from the abdominal wall. Once the uterus was in the correct position, the operator punctures the uterine horn and the semen was injected directly into the lumen of the uterus using an insemination pipette connected to a 1 ml syringe. The same procedure was repeated on the other uterine horn.

### 3. Statistical analysis

Pregnancy rate and number of fetuses per pregnant ewe was compared by GLMM of the Infostat package [22] with the insemination technique and the moment of FTAI (48 h or 54 h) included as fixed effects with its interaction, and the animal as random effect. The significance level was defined for a P value  $<0.05$ .

### 4. Results

Pregnancy rate was affected by the insemination technique and by the moment of FTAI ( $P<0.05$ ), without interaction ( $P= NS$ ). The results are showed in Table 1. In general, fertility was improved as semen deposition was deeper and delayed, with the greatest pregnancy rate obtained with intrauterine FTAI by laparoscopy performed at 54 h from device removal (56.9%, 66/116). Regardless the time of insemination, pregnancy rate was greater for laparoscopic intrauterine than for cervical insemination, and the transcervical method was intermediate (Table 1). For transcervical insemination, pregnancy rate was greater when semen was placed deeper than 4 cm into the cervix (60.0%, Table 2), achieving in this case similar outcome than intrauterine insemination by laparoscopy ( $P= NS$ ). Deposition of semen deeper than 6 cm through the cervix was possible in 9.6% (10/104) of ewes, and only in 8 of them (7.7%) the insemination was completely placed into the uterus. Frequency for depth of semen deposition achieved with

transcervical insemination is showed in Table 2. Regardless the insemination technique, overall results showed greater pregnancy rate with FTAI at 54 h (52.5%, 136/259) than 48 h (36.6%, 116/317) ( $P<0.05$ ).

Table 1. Pregnancy rate obtained with cervical, transcervical or intrauterine laparoscopic FTAI performed at 48 h (46 to 50 h) or 54 h (52 to 56 h) from progesterone intravaginal device removal.

	Pregnancy rate (pregnant/FTAI ewes)			No. fetuses/pregnant ewes	No. ewes FTAI per hour
	FTAI	FTAI	P		
	48h	54h	value		
<b>Cervical FTAI</b>	31.1% <sup>a</sup>	42.3% <sup>a</sup>	0.07	36% <sup>a</sup>	1.20 <sup>a</sup> $85.5\pm7.5^a$
<b>150.10<sup>6</sup> sperm cells</b>	42/135	44/104		86/239	103/86
<b>Transcervical FTAI</b>	32.7% <sup>ab</sup>	53.1% <sup>ab</sup>	<0.05	42.3% <sup>ab</sup>	1.27 <sup>a</sup> $11.4\pm1.6^b$
<b>100.10<sup>6</sup> sperm cells</b>	18/55	26/49		44/104	56/44
<b>Intrauterina IATF</b>	44.1% <sup>b</sup>	56.9% <sup>b</sup>	<0.05	50.2%	1.21 <sup>a</sup> $56.8\pm5.6^c$
<b>75. 10<sup>6</sup> sperm cells</b>	56/127	66/116		122/243	148/122

For the same column, different superscripts  $P < 0.05$ .

Table 2. Depth of semen deposition achieved with transcervical insemination and pregnancy rate obtained with fresh semen (100 x 10<sup>6</sup> sperm cells) after FTAI in multiparous Corriedale ewes.

	<2 cm into the cervix		2 to <4cm into the cervix		4 a <6cm into the cervix		>6cm or intrauterine	
	No. of ewes	Total ewes	No. of ewes	Total ewes	No. of ewes	Total ewes	No. of ewes	Total ewes
<b>No. of ewes/total ewes</b>	12.5%		58.7%		19.2%		9.6%	
	13/104		61/104		20/104		10/104	
	71.2% (74/104)				28.8% (30/104)			
<b>Pregnant/FTAI ewes</b>	38.5%		34.4%		65%		50%	
	5/13		21/61		13/20		5/10	
	35.1% (26/74) <sup>a</sup>				60% (18/30) <sup>b</sup>			

A vs. b,  $P<0.05$ .

## 5. Discussion

The current study demonstrates that greater pregnancy rate is obtained when intrauterine semen deposition is performed, which was achieved mainly with laparoscopy. As an overall outcome, insemination by laparoscopy allowed acceptable pregnancy rate with a lower sperm dose and with a reasonable time required per ewe. The pregnancy rate with the transcervical route was intermediate, demanding more time and animal handling than the other methods. Fixed time artificial insemination performed by cervical route with double semen dose than laparoscopy, resulted in significantly lower pregnancy rate.

Although previous studies have showed that intrauterine insemination by laparoscopy results in greater pregnancy rate than cervical insemination, also using fresh semen and FTAI [7], little information about these three methods associated to FTAI have been reported (with no data available in Corriedale ewes). In Australian Merino sheep, Windsor et al. [23] compared conventional methods using laparoscopic and cervical insemination versus transcervical procedure using the Guelph System [9] in two experiments, but different results were obtained among both experiments that were attributed mainly to the operator skill. In the present study performed in multiparous Corriedale ewes, we found that pregnancy rate obtained with transcervical insemination is intermediate (42.3%, P= NS) in comparison with cervical (36.0%) and intrauterine insemination (50.2%). The transcervical method used in this study is a bit different because it consist of the manipulation of the cervix with the fingers directly by vaginal access instead of transrectal manipulation previously reported [17].

Fertility obtained with transcervical method depends on the penetration into the cervical canal. This technique was more effective when semen deposition was deeper than 4 cm into the cervix. In this case, pregnancy rate was similar than intrauterine laparoscopic insemination, reaching 60.0% of pregnant ewes. However, the negative finding is that the effectiveness of transcervical route to reach the uterus in multiparous Corriedale ewes seems to be low. Only in <30% of ewes semen was placed deeper than 4 cm into the cervix, and only in very few females (<10%) the insemination was performed completely into the uterus. Cervical canal length, tortuosity and penetrability is highly variable between animals, and it is influenced by breed, age, previous lambing, among other factors [4][16][24]. No information is available about the cervical penetration and the use of this technique for insemination in Corriedale ewes, a breed worldwide

used for meat and wool production. This study contributes with novel information in the use of this method, showing that the efficiency for cervical penetration in this breed is relatively low.

From a practical point of view, for large-scale FTAI programs in which 300 to 500 ewes are inseminated every day from 46 to 56 h from device removal, laparoscopy seems to achieve the greatest pregnancy rate using half of sperm dose normally necessary for cervical insemination, and much less time required than for transcervical insemination. The time consuming by the technique is even more relevant for FTAI programs when the moment of insemination is affecting pregnancy rate and the window for insemination must be shortened. Regarding our findings in this study, FTAI should be performed from 52 to 56 h after progesterone device removal, avoiding earlier insemination probably associated to the moment of ovulation with this short-term protocol that was reported occurring in average about 60 h from device removal [20][25]. The need to reduce the period for FTAI imply a reduction in the number of ewes programmed for each day, and thus, a fast and easy method for insemination is recommended.

Although laparoscopy is a minimally invasive procedure, the short time that the ewe remains in the cradle seems to affect pregnancy rate. Hill et al. [26] found that the number of ewes inseminated per hour was associated with pregnancy rate, suggesting that increasing insemination speed improves fertility. The authors recommend to minimize the time each ewe spent restrained in a cradle in order to minimize stress [27] which could affect the pregnancy rate. Animal welfare concerns are permanently taken into account in animal production and the insemination procedures should avoid animal suffering as much as possible. For this reason, the possibility to access the uterine lumen by transcervical route have been proposed. However, this technique seems not to be innocuous to the female, requiring more time per ewe than laparoscopy (~11 vs. ~57 ewes FTAI per hour, respectively). In addition, with the transcervical Guelph System some authors have proposed that cervical traction is a potential source of reduced fertility [28], as well as others suggest that passing through the cervix with a rigid cannula can generate trauma to the animal and ethical concerns [29]. In our study, although any lesion was observed during the procedure such as blood or wound generated with the cannula or clamping, the effectiveness of local anesthesia to avoid the pain generated by clamping was not determined. In summary, comparing to laparoscopy, the only advantage of using transcervical insemination seems to avoid the need of the laparoscopic equipment, but it does not allow the reduction of animal handling, increasing the time required for the procedure.

In conclusion, the current study demonstrates that greater pregnancy rate using FTAI is obtained when the sperm is placed into the uterus, which in Corriedale ewes was achieved only through laparoscopy. Fertility obtained with transcervical route was intermediate, reaching similar values than laparoscopy only if the insemination dose is placed deeper than 4 cm into the cervix, which was achieved in <30% of ewes. In addition, this method involves considerably more time and animal handling than cervical or laparoscopic techniques, and probably requires further improvements to be applied in large-scale FTAI programs.

## 6. REFERENCES

- [1] Menchaca A, Rubianes CE. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 2004;16:403–413.
- [2] Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 2016;86:388-96.
- [3] Evans G, Maxwell W. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths; 1987.
- [4] Kershaw CM, Khalid M, MCgowan MR, Leethongdee SKI, Wax G. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 2005;64:1225–1235.
- [5] Evans G, Maxwell WMC. Frozen storage of semen. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Wellington: Butterworths 1987;122–141.
- [6] Salamon SE, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science* 1995;38:1–36.
- [7] Santos-Neto PC, García-Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science* 2015; 182:125–128.

- [8] Fukui Y, Roberts EM. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology* 1977; 8:77-81.
- [9] Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Sharpe P, Buckrell BC. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology* 1990; 33: 1231-1243.
- [10] Buckrell BC, Buschbeck C, Gar ley CJ, Kroetsch T, McCutcheon W, Martin J, Penner WK, Walton JS. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology* 1994; 42:601-611.
- [11] Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* 2004; 62:990–1002.
- [12] Rabassa VR, Tabeleão VC, Pfeifer LFM, Schneider, Zigner EA, Schossler E, Severo NC, Del Pino FAB, Corrêa MN. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. *Ciência Animal Brasileira* 2007; 8:127-133.
- [13] Álvarez M, Chamorro CA, Kaabi M, Anel-López L, Boixo JC, Anel L, Anel P. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. *Animal Reproduction Science* 2012; 131:153– 159.
- [14] Baterlewski PM, Candappa IBR. Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. *Theriogenology* 2015; 84:1594–1602.
- [15] Sayre BL, Lewis GS. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 19;46:233-241.
- [16] Husein MQ, Bailey MT, Ababneh MM, Romano JE, Crabo BG and Wheaton JE. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology* 1998;49:997-1005.

- [17] Fonseca JF, Zambrinio FN, Alvimb GP, Peixoto MGCD, Verneque RS, Viana JHM. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical Technique. Small Ruminant Research 2013;111:96-99.
- [18] Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Leite CR, Nascimento-Penido PMP, Brandão FZ, Lehloenya KC. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. Theriogenology 2016;86:144–151.
- [19] Russel AJF, Doney, JM, Gunn RG. Subjective assessment of body fat in live sheep. Journal Agricultural Science 1969; 72:451-454.
- [20] Vilariño M, Rubianes E, Vanlier E, Menchaca A. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO). Small Ruminant Research 2010; 91:219–224.
- [21] Evans G, Maxweel WMC. Salomon's inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.
- [22] Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat version 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2015.
- [23] Windsor DP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. Transcervical artificial insemination of Australian merino ewes with frozen-thawed semen. Theriogenology 1994;42:147-I 57.
- [24] Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, de Paz P, Anel L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. Theriogenology 2006;66:1876-1883.
- [25] Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. Theriogenology 2013;79:206-210.

- [26] Hill JR, Thompson JA, Perkins NR. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 merino ewes under commercial conditions: a survey. Theriogenology 1998;49:697-709.
- [27] Murray RD, Ward WR. Welfare implications of modern artificial breeding techniques for dairy cattle and sheep. Veterinary Record 1993;133:283-286.
- [28] Salamon S, Lightfoot RJ. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. III The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. J Reprod Fertil 1970;22:409-423.
- [29] Campbell JA, Harvey TG, McDonald' MF, Sparksman RI. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. Theriogenology 1996; 45:1535-1544.

## **4 CAPITULO 2 - UTILIZAÇÃO DO BE E GNRH EM PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO CURTO DE OVELHAS, UTILIZANDO IMPLANTES DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA.**

### **RESUMO**

Estudos comparando taxa de prenhez em pequenos ruminantes demonstraram a possibilidade do uso de protocolos de curta duração ao invés dos tradicionais protocolos de longa duração. Deste modo, torna-se possível a reutilização de implantes de progesterona. Todavia, a reduzida concentração de progesterona nos dispositivos reutilizados pode influenciar no surgimento da nova onda folicular com probabilidade de induzir a persistência dos folículos pré-ovulatórios. Nestas condições, a utilização de BE no início do protocolo, pode permitir o surgimento de uma nova onda folicular, bem como o uso do GnRH, no momento da inseminação, pode tornar a ovulação mais síncrona. Este estudo avaliou o uso de BE no início de protocolos de curta duração e o uso de GnRH no momento da inseminação de ovelhas Corriedale. Foram utilizadas 794 fêmeas, que receberam o dispositivo intravaginal (DICO®) de terceiro uso, sendo que metade das fêmeas receberam o BE (200 µg de deslorelin). Os implantes foram retirados após 6 dias, quando foi aplicado eCG (300 UI) e prostaglandina (125 µg de cloprosteno de sódio). A IATF foi realizada entre 48h e 56h após a retirada do implante, por laparoscopia. No momento da inseminação, metade das ovelhas que receberam BE no dia 0 e a metade do grupo que não recebeu, foram submetidas a injeção de GnRH (50 µg). A prenhez foi diagnosticada após 30 dias, por ultrassonografia. O uso de BE no dia 0 incrementou a taxa de prenhez (46,4%, 187/403) em relação ao controle (40,4%, 158/391). Já o GnRH não influenciou as taxas de prenhez (43% sem GnRH e 43,9% com GnRH). Conclui-se que o emprego de BE é uma alternativa viável para protocolos utilizando implantes com baixa concentração de progesterona (terceiro uso). Em contrapartida, o emprego de GnRH não produz benefícios, tornando dispensável o seu uso.

**Palavras-chave:** IATF. Ovinos. Indutor de ovulação. Protocolo de sincronização.

## ABSTRACT

### **Estradiol benzoate (BE) and GnRH in short-term ewes protocol with low progesterone devices.**

Studies evaluating pregnancy rate in small ruminants demonstrated that short-term protocols might be used instead the traditional long-term protocols. In addition, these protocols make possible the reuse of progesterone implants. The attenuated increase in progesterone with reused devices may affect the emergence of a new follicular wave, and then to induce persistent preovulatory follicles. Under these conditions, the use of BE at beginning the protocol may be an alternative to allow the emergence of a new wave and the use of GnRH to induce the ovulation make ovulation more synchronous. This study evaluated the use of BE at the beginning of short-term protocols and the use of GnRH at the time of insemination of Corriedale ewes. A total of 794 females were inserted with third use intravaginal device (DICO®), and half of the females received BE estradiol benzoate (200 µg). Implant removal was performed after 6 days and followed by the application of eCG (300 IU) and prostaglandin (125 µg sodium cloprostenol). At the time of insemination, half of the ewes that received BE and half of those that not received, were injected with GnRH (50 µg). IATF was performed by laparoscopy between 48h and 56 h after implant removal. Pregnancy detection was performed after 30 days by ultrasonography. The use of BE on day 0 increased the pregnancy rate (46.4%, 187/403) in comparation to control (40.4%, 158/391). GnRH did not influence pregnancy rates (43% without GnRH and 43.9% with GnRH). It is concluded that the use of BE is a viable alternative for protocols with low concentration of progesterone implants (third use). On the other hand, the use of GnRH does not produce benefits.

**Key-words:** Follicular dynamics. Sheep. Synchronization protocol.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A técnica de sincronização mais utilizada na espécie ovina é baseada no uso de progestágeno intravaginal por um período de 12-14 dias, associado com a administração de eCG. Este protocolo foi elaborado antes de 1990, quando não havia o conhecimento da dinâmica folicular em pequenos ruminantes (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Em ovelhas, um prolongado tratamento com progestágenos geralmente é associado a baixas taxas de concepção (VIÑOLES et al., 2001) e variáveis taxas de fertilidade (GORDON 1983; MENCHACA; RUBIANES, 2004), por induzirem a ovulação de folículos velhos (VIÑOLES et al., 2001) e produzirem alto índice de vaginite.

Viñoles et al. (1999) e Ungerfeld e Rubianes (1999), em ovelhas de corte, encontraram melhora significativa nas taxas de prenhez com o uso do protocolo curto com 6 dias, em relação ao longo (12 dias) de progesterona. Desde então, os protocolos curtos vêm sendo ajustados buscando melhorar a sincronização e a taxa de prenhez.

A taxa de prenhez é afetada pelo implante de progesterona utilizado (CIDR-G: 55,8%, DICO: 55,7%, MAP esponjas: 37,4%) sendo CIDR® e DICO® semelhantes e superiores a esponjas (SANTOS NETO et al., 2015). O Dispositivo Intravaginal Caprino e Ovino (DICO®), que contém 0,3g de progesterona foi testado em relação a sua reutilização em protocolos curtos e proporcionou uma melhor relação custo benefício do implante (VILARIÑO et al., 2010). Porém, estudos demonstraram que quando reutilizados, os implantes não permitem um adequado pico de progesterona e muitas vezes não promove a indução de uma nova onda folicular.

Um estudo avaliando a reutilização de implante CIDR-G por até 3 vezes, demonstrou que o implante de primeiro uso promoveu a emergência de uma nova onda folicular (*turn over*) em 100% dos animais, em contraste com os de segundo e terceiro uso (*turn over* = 80%). A taxa de prenhez também foi inferior com o implante de terceiro uso, possivelmente pelo baixo nível de progesterona, que não desencadeou a nova onda folicular (VILARIÑO et al., 2011).

Em relação ao DICO, a porcentagem de ovelhas que ovularam um folículo da nova onda foi de 100% (10/10) com dispositivo de primeiro uso, 77,8% (7/9) com dispositivo de segundo uso e 80% (8/10) com o de e terceiro uso. Com os implantes de terceiro uso, o nível de progesterona sérica no decorrer do protocolo foi menor (VILARIÑO et al., 2013). A reduzida concentração de progesterona, com dispositivos reutilizados, pode afetar o surgimento da nova onda folicular,

possibilitando a persistência de folículos pré-ovulatórios. Por esta razão, há uma tendência ( $P < 0,06$ ) de os implantes de terceiro uso proporcionarem taxas de prenhez 10% menores do que os implantes de primeiro e segundo uso (VILARIÑO et al., 2013).

A administração de estradiol-17 $\beta$  em ovelhas produziu efeitos semelhantes aos observados nos bovinos, com regressão do folículo dominante e emergência de uma nova onda folicular três dias mais tarde (MEIKLE et al., 2001). Barrett et al. (2008) confirmaram este efeito do estradiol-17 $\beta$  (E2) em ovelhas em anestro e observaram que a associação do E2 ao progestágeno (MAP), com a aplicação de eCG no final do protocolo, não só promove a emergência e sincronia da onda folicular, como melhora a sincronização das ovulações. A aplicação de BE se mostra como uma alternativa para possibilitar um melhor aproveitamento do implante de terceiro uso, mantendo as taxas de sincronização em níveis mais aceitáveis.

Baixos níveis de progesterona sérica aumentam a frequência de pulsos de LH, o que aumenta o tamanho do folículo dominante e realiza o *feedback* positivo do estradiol com o eixo GnRH e LH. Concentrações subluteais de progesterona fazem com que aumente os pulsos LH, porém sem a ocorrência do pico, determinando que o maior folículo persista e a dominância seja prolongada (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Uma alternativa que já foi testada em outras espécies é o uso de indutores de ovulação. Em cabras, Pierson (2003) demonstrou sucesso na indução do pico de LH aplicando GnRH 24h após a retirada do dispositivo intravaginal e administrando eCG (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Em protocolos curtos para ovinos, esses indutores ainda não foram avaliados, o que motiva investigações.

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de BE no dia 0 (inserção do dispositivo intravaginal), com protocolos curtos de progesterona, empregando implantes de baixa concentração de progesterona, bem como avaliar o efeito da aplicação de GnRH (deslorelin) no momento da inseminação, como indutor de ovulação.

#### 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no departamento de Tacuarembó/Uruguai ( $33^{\circ}$  S) com 794 fêmeas cruzadas Merino e Corridale no mês de maio de 2016, divididas em três repetições. No momento da introdução do dispositivo intravaginal caprino ovino (DICO®) de terceiro uso, metade das fêmeas recebeu o BE (200  $\mu$ g) e a outra metade não. A retirada do implante foi realizada após

seis dias da inserção e seguida da aplicação de eCG (300 UI) e prostaglandina (125 µg de cloprosteno de sódio).

A IATF foi realizada por laparoscopia, entre 48h e 56h após a retirada do implante. Foi utilizado sêmen congelado, com dose inseminante de 70 milhões de espermatozoides. No momento da inseminação, na maca de laparoscopia, metade das ovelhas que recebeu o BE no dia 0, também recebeu o GnRH (50 µg de deslorelin), assim como a metade das ovelhas que não receberam o BE no dia 0, constituindo quatro grupos experimentais.

De acordo com Ishwar (1995) a prenhez foi confirmada após o período de 30 dias por ultrassonografia transretal com transdutor linear 7,5Mhz (Aloka 500SSD, Tokio, Japão).

#### 4.3 ANÁLISE DE ESTATÍSTICA

A taxa de prenhez foi comparada pelo GLMM do pacote Infostat, através do modelo linear generalizado e misto. Os fatores fixos foram os tratamentos com ou sem BE e com ou sem GnRH e a interação entre ambos. O nível de significância foi definido para um valor de  $P < 0,05$ .

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito da aplicação de BE no início de protocolo curto de sincronização do estro em ovelhas, com implantes de terceiro uso, assim como o uso de GnRH. A administração de BE no dia 0 do protocolo curto, com implante de terceiro uso, proporcionou um aumento da taxa de prenhez das ovelhas (Tabela 1).

Tabela1 - Percentual de prenhez obtida com protocolo curto (6 dias), empregando implantes de progesterona de terceiro uso, avaliando a aplicação ou não de BE no dia 0 e a aplicação ou não de GnRH no momento da inseminação, em ovelhas.

	Sem BE	Com BE	Efeito principal (P=NS)
Sem GnRH	38,3% (74/193)	47,3% (98/207)	43,0% (172/400)
Com GnRH	42,4% (84/198)	45,4% (89/196)	43,9% (173/394)
Somatório	40,4% (158/391) <sup>a</sup>	46,4% (187/403) <sup>b</sup>	

Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,05).

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

A adoção de protocolos curtos de indução e sincronização de estro, cria a possibilidade de se reutilizar os implantes de progesterona, proporcionando uma considerável redução no custo do processo. Implantes constituídos por 0,3g de progesterona (DICO®), em seu primeiro uso, demonstraram ser capazes de induzir o desenvolvimento de uma nova onda folicular, em todas as fêmeas (VILARIÑO et al., 2011).

Todavia, mesmo utilizando protocolos curtos, ocorre uma menor liberação de progestágenos, quando os implantes são reutilizados. Vilariño et al. (2011 e 2013) demonstraram que num segundo, ou terceiro uso destes implantes, não é possível manter a concentração de progesterona necessária para promover a emergência de uma nova onda folicular em todas as fêmeas. Isto ocorre em função de os implantes de segundo e terceiro uso serem incapazes de promover o “*turn over*” folicular, determinando a redução na taxa de prenhez, quando se utiliza os implantes CIDR® e DICO® de terceiro uso (VILARIÑO et al., 2011 e 2013). O emprego de BE poderia ser uma alternativa para superar esse entrave de sincronização, já que poderia determinar o início de uma nova onda folicular, no decorrer do protocolo.

O incremento na taxa de prenhez observado neste estudo, ao introduzir o BE no dia 0 do protocolo, demonstra que esta é uma adequada alternativa para viabilizar a reutilização dos implantes de progesterona de terceiro uso, quando se adota o protocolo curto. Aparentemente, ao aplicar o BE houve um auxílio hormonal para que se iniciasse uma nova onda folicular no decorrer

do protocolo. Fato semelhante foi observado por Barret et al. (2008), com a associação de E2 a um progestágeno (acetilmegoxiprogesterona) e aplicação de eCG no final de protocolo longo, que promoveu a emergência e sincronia da onda de crescimento folicular, bem como melhorou a sincronização das ovulações.

Todavia, a comprovação do início de uma nova onda folicular com a aplicação de BE neste estudo, somente poderá ser comprovada com a avaliação do estudo da dinâmica folicular, realizada com fêmeas submetidas ao protocolo avaliado. A manutenção de adequadas taxas de prenhez, nos três usos dos dispositivos, proporciona uma relação custo benefício altamente positiva para o sistema de produção (VILARIÑO, 2013).

Em condições normais, baixos níveis de progesterona sérica aumentam a frequência de pulsos de LH, o que determina o crescimento do folículo maior (dominante) e oportuniza o feedback positivo do estradiol com o GnRH e LH. A reutilização de implantes de progesterona, ao atenuar os níveis de progesterona pode afetar o surgimento de uma nova onda folicular, com a real possibilidade de induzir a persistência dos folículos pré-ovulatórios (VILARIÑO et al., 2013). Concentrações subluteais de progesterona fazem com que os pulsos LH aumentem, porém sem a ocorrência do pico, determinando que o grande folículo persista e a dominância seja prolongada (MENCHACA; RUBIANES, 2004).

Com base nestes fatos, o uso do GnRH (deslorelin) no momento da inseminação, poderia ser o auxílio necessário para a indução da ovulação destes folículos. Todavia, ao contrário do esperado, neste estudo a aplicação de GnRH no momento da ovulação, não melhorou as taxas de prenhez das ovelhas, em relação aos grupos sem GnRH (43,9% versus 43%, respectivamente). Com base na taxa de prenhez obtida, não existem benefícios que justifiquem o uso de GnRH nestes protocolos.

Os dados obtidos permitem concluir que a administração de 200 µg BE no dia 0 de protocolos curtos para ovelhas, é uma alternativa adequada para a utilização de implantes de progesterona de terceiro uso, possibilitando adequadas taxas de prenhez. Já a utilização de GnRH no momento da inseminação se mostrou inefetiva para aumentar a taxa de prenhez. A finalização dos estudos de dinâmica folicular, poderá oportunizar a melhor compreensão dos resultados observados.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETT, D.M., BARTLEWSKI, P.M., DUGGAVATHI, R., DAVIES, K.L., HUCHKOWSKY, S.L., EPP, T., RAWLINGS, N.C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v.69, p.827-836. 2008.

GORDON, I. **Fixed-time sheep artificial insemination**. In “**Controlled Breeding in Farm Animals**. (Ed. I. Gordon). Pergamon Press: Oxford,UK. p.197-208. 1983.

ISHWAR, A.K. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v.17. p. 37-44. 1995.

MENCHACA, A., RUBIANES, C.E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.403-413. 2004.

MEIKLE, A., FORSBERG, M., GARÓFALO, E.G., CARLSSON M.A., LUNDEHEIMC, N., RUBIANES, E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrous ewes after treatment with estradiol. **Animal Reproduction Science**, v.67, p. 79–90, 2001.

PIERSON, J.T., BALDASSARRE, H., KEEFER, C.L., DOWNEY, B.R. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. **Theriogenology**, v.60, p.397–406.2003.

SANTOS-NETO, P.C., GARCÍA-PINTOS, C., PINCZAK, A., MENCHACA, A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. **Livestock Science**, v.182, p.125–128, 2015.

UNGERFELD, R. e RUBIANES, E. Effectiveness of shortterm progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. **Animal Science**, v.68, p.349–353. 1999.

VILARIÑO, M., RUBIANES, E., VANLIER, E., MENCHACA, A. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICOs). **Small Ruminant Research**. v. 91, p.219–224. 2010.

VILARIÑO, M., RUBIANES, E., MENCHACA, A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term protocol for time artificial insemination in goats. **Theriogenology**, v.75, p.1195–1200. 2011.

VILARIÑO, M., RUBIANES, E., MENCHACA, A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed- time artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v.79, p.206–210. 2013.

VIÑOLES, C., MEIKLE, A., FORSBERG, M., RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**, v.51, p.1351–1361.1999.

VIÑOLES, C., FORSBERG, M., BANCHERO, G., RUBIANES, E. Effect of long term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology** 2001; 55:993–04.



## **5 CAPITULO 3 - DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS CRUZA CORRIEDEALE X MERINO, UTILIZANDO BE NO DIA 0 E GNRH COMO INDUTOR DA OVULAÇÃO, EM PROTOCOLO CURTO COM IMPLANTE DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA (DADOS PARCIAIS)**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

Com o domínio da técnica de avaliação da dinâmica folicular em ovinos por ultrassonografia a partir da década de 90, se tornou possível adquirir conhecimentos mais concretos sobre o funcionamento da dinâmica ovariana na ovelha (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Com a ultrassonografia, torna-se possível o acompanhamento dos momentos de emergência de onda, crescimento folicular e ovulação, diferente de trabalhos anteriores que realizavam avaliações de ovário empregando a laparoscopia ou laparotomia, em momentos pontuais (BOSCOS et al., 2002).

A determinação da concentração hormonal plasmática também pode auxiliar no entendimento e na definição da real funcionalidade das estruturas mapeadas por ultrassonografia. Como por exemplo se um cisto ovariano é funcional ou afuncional, se o folículo está liberando ou não estrógeno, ou até mesmo a real concentração hormonal plasmática, após a aplicação de hormônios exógenos. Este alicerce vem sendo utilizado para melhor compreender os acontecimentos e a efetividade de diferentes protocolos (VILARIÑO et al., 2010; VILARIÑO et al., 2011).

Assim, como forma de interpretar os resultados obtidos no estudo apresentado no capítulo três, que avaliou o BE como possível indutor de uma nova onda folicular, quando os níveis de progesterona são baixos, optou-se pela realização de um novo estudo, com o propósito mapear a dinâmica folicular do período compreendido desde dois dias antes do início do protocolo, até o momento da ovulação, utilizando implantes de terceiro uso.

A avaliação dos resultados determinará, com maior segurança, o momento da emergência da onda folicular, assim como o momento da ovulação em cada grupo experimental. Os dados apresentados são parciais, já que as dosagens hormonais, assim como a respectiva avaliação estatística, não foram concluídas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante os meses de abril e maio de 2017, no campo experimental 1 da faculdade de Medicina Veterinária do Uruguai. Os grupos experimentais foram semelhantes aos avaliados no estudo 2, já que o objetivo foi aprofundar o entendimento dos resultados obtidos anteriormente. Durante o primeiro mês foi realizado um treinamento, buscando a capacitação e o aprimoramento da técnica de avaliação da dinâmica folicular por ultrassonografia via transretal de ovários de ovelha. Para realização do procedimento, a ovelha foi mantida em estação em um tronco. Inicialmente as fezes eram removidas do reto e então injetado 60 mL de uma emulsão de carboximetilcelulose. O transdutor foi fixado com fita adesiva em uma guia construída em plástico, que assegurava firmeza durante a manipulação do transdutor, para localização dos ovários.

Após o período de treinamento e a adaptação dos animais; quarenta ovelhas cruzadas Merino x Corriedale, foram selecionadas para a avaliação ultrassonográfica. Os animais foram divididos em dois grupos com vinte animais (duas repetições) para possibilitar o mapeamento do ovário de cada indivíduo, dentro do tempo estipulado. Em cada repetição, inicialmente os animais foram submetidos a duas aplicações de prostaglandina (125 µg de cloprostenol de sódio, D + cloprostenol, Ciclase, Syntex, Buenos Aires, Argentina) com o intervalo de oito dias antes de receberem o dispositivo intravaginal de progesterona de terceiro uso, que permaneceu por seis dias. Na inserção do implante, metade das ovelhas recebeu BE (200 µg) e 48 horas após a retirada, metade das ovelhas que receberam BE, assim como metade das ovelhas que não receberam o BE, foram injetadas com GnRH (50µg). Dois dias antes da inserção dos implantes, foi iniciado o monitoramento dos ovários das ovelhas, que eram mapeados através de ultrassonografia transretal, com transdutor linear de 7,5MHz de frequência. Todas as avaliações foram gravadas e armazenadas para posterior revisão das imagens. A ovulação era considerada após constatação da ausência do folículo dominante, sendo confirmado na próxima avaliação, após 12 horas do observado.

Amostras de sangue foram coletadas diariamente, por venopunção da Jugular, antes de iniciar as ultrassonografias pela manhã. As amostras eram processadas e armazenadas para a posterior determinação da concentração plasmática de estrógeno e progesterona. Desde a inserção dos implantes, capões androgenizados foram agregados para evidenciar a manifestação de cio. A

tinta marcadora era retocada, entre o peito e o prepúcio, diariamente pela manhã, quando já era verificado se alguma ovelha havia entrado em cio.

### 5.3 RESULTADOS PARCIAIS OBTIDOS

Os resultados obtidos no experimento de dinâmica folicular estão sendo processados e analisados, porém já foi possível observar alguns fatos ocorridos. Um acontecimento observado foi a manifestação de estro durante o protocolo em doze das quarenta ovelhas, sendo que destas, dez foram marcadas pelo rufião androgenizado nas primeiras 48 horas após a aplicação do BE. Isto indica um provável efeito colateral da aplicação do BE, em fêmeas com implantes de progesterona reutilizados. Os outros dois animais que manifestaram cio, sem a aplicação do BE, a manifestação ocorreu as 60 e 96 horas após a colocação do implante, demonstrando uma provável ineficácia de liberação de progesterona do implante, que não bloqueou a manifestação do estro e a possível ovulação.

A aplicação do BE no dia 0 tornou o momento do estro após a retirada do implante mais próximo ao observado quando utilizados implantes novos (33,3 horas após a retirada). Já as ovelhas que não receberam o BE, apresentaram um cio antecipado (22,8 horas após a retirada). O momento do desaparecimento do folículo dominante também foi antecipado nas ovelhas em que não foi aplicado o BE (50,6 h após a remoção do implante), em relação aos animais que receberam o BE (62 horas da remoção do implante).

O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi 8,6mm para o grupo sem BE e sem GnRH, 7,7mm para o grupo sem BE com GnRH, 7,5mm para o grupo com BE e sem GnRH e 7,3mm para com BE e com GnRH. O maior diâmetro do folículo pré-ovulatório no grupo sem BE e sem GnRH, pode estar relacionado ao fato de que nesse grupo, apenas 37,5% das ovelhas ovularam um folículo proveniente de uma nova onda folicular. Em contrapartida, a ovulação de um folículo proveniente de uma nova onda folicular ocorreu em 90% dos animais que receberam o BE no dia 0.

Outro fato interessante é que quatro ovelhas não ovularam, sendo uma do grupo com BE e com GnRH, uma do grupo com BE e sem GnRH e duas do grupo sem BE e sem GnRH. Essas dinâmicas serão reavaliadas para elucidar os prováveis motivos (folículo afuncional, cisto folicular, tamanho de folículo insuficiente, ovulação de folículo de menor tamanho) para então tomar decisões sobre a condução da análise estatística.

As amostras de plasma sanguíneo para determinação da concentração plasmática de progesterona e estrógeno estão armazenadas, para posterior avaliação. A determinação das concentrações plasmáticas de estrógeno e progesterona irão auxiliar no entendimento e na definição da real funcionalidade das estruturas mapeadas por ultrassonografia, assim como as alterações da concentração hormonal promovida pela aplicação dos hormônios exógenos.

## 6 CAPÍTULO 4 - TREALOSE E PLASMA SEMINAL LIOFILIZADO EQUINO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO

### RESUMO

A baixa fertilidade do sêmen congelado ovino se deve as alterações físicas e químicas ocorridas durante o processo de criopreservação, que promovem a prematura capacitação e a redução da motilidade e da viabilidade espermática. Assim, estratégias que possibilitem o prolongamento da viabilidade do sêmen congelado e que otimizem o transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea, são necessárias. Dentre as estratégias pesquisadas, o uso de trealose e PSLE, tem se mostrado promissores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o emprego da trealose e da associação trealose + PSLE ao diluente de congelamento, sobre as características do sêmen ovino após o descongelamento. O PS equino foi obtido de ejaculados coletados de garanhões aptos a reprodução a centrifugações sucessivas. O *pool* de PS foi congelado e posteriormente liofilizado. Uma amostra do plasma liofilizado foi submetida à dosagem proteica por Bradford. O sêmen ovino para congelamento foi obtido por vagina artificial, de três carneiros sexualmente maduros. Depois de avaliados, os ejaculados constituíram um *pool*, que foi fracionado em três grupos para o congelamento: Controle: sêmen coletado + diluente Tris-gema glicerolado; Trealose (TT): sêmen coletado + diluente com adição de 100 mM de trealose e Trealose + PSLE (TTP): sêmen coletado + diluente com adição de 100 mM de trealose e 600 µg de proteína de PSLE. As doses foram envasadas em palhetas 0,25mL com uma concentração de 100 milhões de espermatozoides por palheta. O resfriamento e congelamento foram realizados no equipamento TK3000 e as doses foram armazenadas em botijão criogênico. Foram realizadas dez repetições, onde duas palhetas de cada repetição foram avaliadas. Para análise da viabilidade, o sêmen foi descongelado a 37 °C por 20 segundos e em seguida submetido às avaliações *in vitro*. As avaliações consistiram em Teste de Termo resistência (TTR), Teste Hiposmótico (HOST), Teste de migração ascendente *Swim Up* e morfologia espermática. Foi observado um efeito positivo da adição de trealose ou trealose + PSLE na motilidade e vigor espermático do sêmen descongelado (0 h) em relação ao controle (TC = 36,5%/3, TTP = 42%/3,3 e TT = 43,5%/3,3). A adição de Trealose mostrou-se como o tratamento mais efetivo, permitindo maior motilidade progressiva em todos os tempos do TTR. Quanto ao vigor, no decorrer do TTR a trealose apresentou superioridade aos demais tratamentos, exceto na primeira hora. No teste hiposmótico observou-se maior taxa de integridade de membrana nos espermatozoides tratados com trealose + PSLE (38,6%), que foram superiores ao controle (25,8%), porém não diferiram do grupo tratado com trealose (32,7%). Em relação à morfologia espermática (espermatozoides normais), não houve diferença entre os grupos controle (90,2%), trealose+plasma (94,0%) e trealose (91,1%). A maior migração dos espermatozoides após *swim up* foi obtida no grupo trealose + PSLE ( $4,2 \times 10^6$  espermatozoides/mL), que foi superior ao grupo trealose ( $3,2 \times 10^6$  espermatozoides/mL), sendo ambos superiores ao grupo controle ( $1,9 \times 10^6$  espermatozoides/mL). Nas avaliações realizadas após a submissão ao *swim up*, observou-se maior motilidade progressiva nos grupos trealose (85%) e trealose+PSLE (83,5%) que não diferiram entre si e foram superiores ao controle (78%). Também foi observado maior vigor no grupo trealose (3,4) que não diferiu do grupo trealose + PSLE (3,3), mas foi superior ao grupo controle (3,2). A adição de 100 mM de trealose, ou de 100 mM de trealose + 600 µg de proteína de PSLE, adicionados ao meio de congelamento, melhoraram as características funcionais do sêmen ovino após o descongelamento. O

tratamento com adição de 100 mM de trealose proporciona maior viabilidade ao sêmen ovino após o descongelamento ao decorrer do TTR, porém o tratamento trealose + PSLE proporciona maior migração espermática e integridade de membrana, demonstrando a necessidade de testes *in vivo*.

**Palavras-Chave:** Criopreservação. Aditivos. Motilidade espermática. TTR.

## ABSTRACT

The low fertility of ram frozen semen is due to the physical and chemical changes that occur during the cryopreservation. The process promote premature capacitation and the reduction of sperm motility and viability. Therefore, strategies are necessary to promote the increase viability of frozen semen, and to optimize the sperm transport along the female reproductive tract. Among the strategies, the use of trehalose and lyophilized equine seminal plasma (LESP) are promising strategies. The aim of this study was to evaluate the use of trehalose and the association trehalose plus LESP in the freezing medium, on the characteristics of ram semen after thawing. LESP was obtained from stallions ejaculates after successive centrifugations of seminal plasma that was further frozen and later lyophilized. The lyophilized plasma was submitted to protein dosage by Bradford methodology. Ram semen for freezing was obtained by artificial vagina from 3 mature males. After evaluated, the ejaculates constituted a *pool*, which was fractionated into 3 groups for freezing: Control: semen collected + Tris-glycerolate diluent; Trehalose (TT): semen collected + diluent added with 100 mM trehalose, and Trehalose + LESP (TTP): collected semen + diluent with addition of 100 mM trehalose and 600 µg of LESP protein. Semen were loaded in 0.25 mL straws with 100 million spermatozoa concentration. Cooling and freezing were performed on the TK3000 equipment, and the straws were stored in cryogenic container. Ten replicates were performed, being 2 straw of each replicate analyzed. For evaluation of viability, the semen was thawed at 37 °C during 20 seconds and then subjected to *in vitro* evaluations. The evaluations consisted of Thermo Resistance Test (TRT), Hyposmotic Test (HOST), *Swim Up* and sperm morphology. A positive effect of addition of Trehalose or Trehalose + LESP was observed on motility and sperm vigor of the thawed semen (0 h) compared to the control (TC = 36.5% / 3, TTP = 42% / 3.3 and TT = 43.5% / 3.3). The addition of Trehalose was the most effective treatment, showing higher progressive motility at any time of TRT. Regarding the vigor, during the TRT, Trehalose was superior to all other treatments, except for the first hour. In the hyposmotic test, a higher rate of membrane integrity was observed in spermatozoa treated with Trehalose + LESP (38.6%), which were higher than the control (25.8%), but did not differ from Trehalose treated group (32.7 %). In relation to sperm morphology (normal spermatozoa), there was no difference between the control (90.2%), Trehalose + plasma (94.0%) and Trehalose (91.1%) groups. The highest sperm migration after *swim up* was obtained in the Trehalose + LESP group ( $4.2 \times 10^6$  sperm / mL), which was superior to the Trehalose group ( $3.2 \times 10^6$  spermatozoa / mL), and both were superior to the control group ( $1.9 \times 10^6$  spermatozoa / mL). In the evaluations performed after submission to *Swim up*, higher progressive motility was observed in the Trehalose (85%) and Trehalose + LESP (83.5%) groups, which did not differ among them and were superior to the control group (78%). Higher vigor was also observed in the Trehalose group (3.4), which did not differ from Trehalose + LESP group (3.3), but was superior to the control group (3.2). Addition of 100 mM trehalose, or 100 mM trehalose + 600 µg lyophilized equine seminal plasma protein, added to the freezing medium, improves the functional characteristics of ram semen after thawing. The addition of 100 mM of trehalose provided the highest viability to the ovine semen, however trehalose + LESP treatment was high sperm migration and membrane integrity evidencing the need of *in vivo* tests.

**Keywords** – Cryopreservation. Additives. Sperm motility. TRT.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O congelamento e descongelamento do sêmen ovino reduzem a motilidade e o transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (SALOMON; MAXWELL, 1995). Isto ocorre devido a lesões estruturais, bioquímicas e funcionais, causadas no processamento do sêmen. Mesmo os espermatozoides que se mantém vivos e móveis após descongelamento tem a sua viabilidade diminuída no trato reprodutivo da fêmea, em comparação aos não criopreservados (MAXWELL e WATSON, 1996). Durante a criopreservação, as deficiências funcionais observadas nas células espermáticas de carneiros devem-se ao elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, existentes na membrana dos espermatozoides (WATSON, 1995). A criolesão espermática promove a prematura indução de um estado semelhante a capacitação, a chamada criocapacitação (BAILEY et al., 2000). Esta capacitação prematura do espermatozoide altera sua motilidade, viabilidade e posteriormente a sua longevidade (GILLAN; MAXWELL, 1999), resultando em menores taxas de prenhez com sêmen congelado.

Alternativas que preservem a viabilidade seminal após o descongelamento vão possibilitar que um maior número de espermatozoides chegue ao sítio da fecundação, aumentando as taxas de prenhez. Nesse sentido, diversos aditivos têm sido utilizados visando prevenir ou reduzir os danos causados durante o processamento do sêmen, com destaque para a trealose (AISEN et al., 2002) e o PS (LEAHY et al., 2010).

A trealose é um dissacarídeo que apresenta diversas funções, como o aporte energético aos espermatozoides, a manutenção do equilíbrio osmótico do meio e função crioprotetora, desidratando as células espermáticas e minimizando os efeitos causados pela formação de cristais de gelo intracelular. Em função disso, a trealose é incluída em diluentes de sêmen, para aumentar a fertilidade após o descongelamento (AISEN et al., 2002). Além disso, este açúcar é um antioxidante e oferece proteção às membranas de espermatozoides de carneiro submetidos a baixa temperatura (LOPEZ-SAAZ et al., 2000). A trealose também interage com os fosfolipídios e proteínas da membrana, proporcionando mais flexibilidade, o que previne criolesões (AISEN et al., 2002; BUCAK et al., 2007). Assim, a suplementação de trealose em diluentes de sêmen melhora a viabilidade e motilidade de sêmen ovino refrigerado ou congelado (BUCAK et al., 2007).

O PS também tem sido utilizado em protocolos de congelamento de sêmen ovino (EVANS et al., 2000; DOMINGUEZ et al., 2008; LEAHY et al., 2009; LEAHY et al., 2010), minimizando

os danos causados pela criopreservação. O PS protege e repara os espermatozoides, tanto no nível estrutural, quanto no funcional (MUIÑO-BLANCO et al., 2008). O PS contém proteínas que previnem a capacitação, aumentando a longevidade do sêmen de carneiro congelado (MAXWELL et al., 2007), melhorando a motilidade, a viabilidade, a integridade de acrossoma e a respiração mitocondrial no sêmen descongelado.

Embora o efeito benéfico do PS ovino esteja bem demonstrado na qualidade espermática e na fertilidade de ovelhas inseminadas com sêmen congelado, (MAXWELL; JOHNSON, 1999), o seu baixo volume ejaculado e o aumento no volume da dose inseminante, com a consequente redução da concentração, limitam o seu emprego. A viabilidade do uso de PS heterólogo, especialmente o PS equino já foi comprovada (MARTINS et al., 2013). Isto, associado somente ao processo de liofilização, possibilita a incorporação do PS ao diluente, praticamente sem alteração da concentração da dose inseminante. O efeito positivo do PS equino liofilizado na motilidade espermática e na taxa de clivagem após FIV heteróloga, com sêmen ovino congelado, já foi demonstrado (CASALI, 2014).

Desta forma, é justificada a avaliação da associação de PSLE com a trealose sobre a criotolerância de espermatozoides ovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da trealose e da associação de trealose e PSLE ao diluente de congelamento, sobre as características do sêmen ovino, após o descongelamento.

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal Professor Assis Roberto de Bem, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, município de Lages/SC e na Estação Experimental de Pesquisa Agropecuária (EPAGRI) em Lages/SC.

### 6.2.1 Obtenção do plasma seminal

O PS equino foi coletado e processado em época de estação de monta da espécie (novembro). Quatro garanhões sexualmente maduros foram coletados com o auxílio da vagina artificial, para obtenção de plasma seminal. Logo após a obtenção do sêmen, a viabilidade

espermática foi avaliada, sendo utilizados apenas os ejaculados que apresentaram aspecto, vigor e motilidade espermática progressiva, compatíveis com os padrões mínimos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

A seguir, os ejaculados foram submetidos a centrifugações sucessivas até não haver formação de precipitado (5000 rpm em Centrífuga Fanem Baby®). O pellet formado foi descartado e o sobrenadante centrifugado em ciclos subsequentes. Em seguida foi constituído um *pool* de PS, que foi liofilizado em um liofilizador Christ Alpha 1-4 Freeze Dryer. O plasma liofilizado foi submetido à determinação da concentração proteica espectrofotometria direta, segundo a metodologia preconizada por Bradford.

### **6.2.2 Obtenção e processamento do sêmen**

O sêmen ovino foi obtido de ejaculados de três carneiros da raça Lacaune, sexualmente maduros (3-4 anos de idade), mantidos sob o mesmo manejo, em condições ambientais e mineralização *ad libitum*. A coleta de sêmen foi realizada com o auxílio de vagina artificial e o sêmen avaliado segundo os parâmetros preconizados pelo CBRA (2013). O volume dos ejaculados considerados viáveis foi utilizado para a confecção de um *pool*. Em seguida, o *pool* foi dividido em três alíquotas divididas entre os grupos experimentais, já diluídos até a concentração de 100 milhões de espermatozoides por palheta 0,25 mL.

Os grupos experimentais foram: grupo 1 (controle) no qual o sêmen foi diluído em meio Tris-gema glicerolado segundo Evans e Maxwell (1987). Grupo 2 (TT) onde o sêmen foi diluído com o meio Tris-gema glicerolado com a adição de 100mM de trealose (AISEN et al., 2002) e grupo 3 (TTP) onde o sêmen foi diluído com o meio Tris-gema glicerolado com a adição de 100 mM de trealose e 600 µg de proteína de PSLE. A curva de resfriamento (-0,5° por min) e congelamento foi realizada em máquina TK3000 e o sêmen envasado em palhetas de 0,25 mL e armazenado em botijão criogênico para posterior avaliação.

### **6.2.3 Avaliações pós descongelamento**

O sêmen foi descongelado a 37 °C por 20 segundos e em seguida submetido às avaliações *in vitro*. Foi avaliada a motilidade e o vigor, no decorrer do teste de termoresistência (TTR), a

integridade de membrana por teste hiposmótico (HOST), a migração espermática por *swim up* e a morfologia espermática.

Para avaliação da integridade de membrana foi adicionado 10 µL de sêmen a uma solução hipoosmótica de 50 mOsm por 15 min. Posteriormente foi realizada a avaliação em microscópio óptico, sendo contadas 200 células espermáticas por lâmina. Células com cauda dobrada indicavam membrana íntegra. Para avaliação de migração ascendente, por *swim up*, foram depositados 100 µL de sêmen no fundo de um tudo cônico com 1 mL de meio sperm TALP, mantidos em banho maria a 37° C. Permitiu-se a migração por 30 minutos, quando o sobrenadante (850 µL) foi retirado e centrifugado para a realização da avaliação da motilidade espermática e concentração em câmara de Neubauer. A avaliação da morfologia foi realizada através de esfregaço em lâmina que após seca foi corada 1min com corante vermelho congo em solução saturada e 30 segundos na violeta de genciana 0,5% (Coloração de Cerowski). Após, foi realizada a avaliação de 200 células por lâmina, com a identificação das patologias espermáticas. Foram realizadas cinco repetições com 2 palhetas cada.

### 6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação dentro de um mesmo tempo de TTR, patologias espermáticas, teste hiposmótico e *swim up*, entre os grupos avaliadas pelo Teste T. Para comparar a motilidade e vigor ao longo do tempo de TTR foi utilizado o Teste Tukey. Todas as avaliações foram realizadas com 5% de significância.

### 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma variação na osmolaridade dos diferentes grupos experimentais. A osmolaridade foi determinada na ausência do crioprotetor, sendo de 320 mOsm no grupo controle, 350 mOsm no grupo Trealose e 380 mOsm no grupo Trealose + Plasma seminal liofilizado equino.

Pode-se observar um efeito positivo da adição de trealose ou trealose + PS na motilidade e vigor espermático do sêmen descongelado (0 h), em relação ao controle (TC = 36,5%/3, TTP = 42%/3,3 e TT = 43,5%/3,3). A adição de trealose mostrou-se como o tratamento mais efetivo,

permitindo maior motilidade progressiva em todos os tempos testados no decorrer do TTR (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com os observados por Chillar et al., (2012), que obtiveram melhora na qualidade de sêmen bovino, com aumento da motilidade e da integridade da membrana. Sabe-se que a motilidade espermática é uma das características mais importantes na avaliação espermática, sendo uma variável que afeta altamente a fertilidade do reprodutor, principalmente se associada a um alto vigor. Quanto ao vigor, no decorrer do TTR, a trealose apresentou superioridade aos demais tratamentos, exceto na primeira hora.

Em relação ao tratamento trealose + PSLE, embora tenha proporcionado resultados superiores ao tratamento controle, estes foram inferiores ao emprego da trealose isoladamente. Possivelmente estes resultados inferiores sejam decorrentes de uma excessiva osmolaridade do meio, proporcionada pela inclusão simultânea dos dois aditivos (380 mOsm).

Tabela 1- Percentual de motilidade progressiva e vigor (escala de 1-5) de sêmen ovino congelado em Tris gema glicerolado (Controle) ou adicionado de trealose + plasma seminal equino liofilizado (PSLE) ou trealose. As avaliações foram realizadas logo após o descongelamento (Tempo zero) ou com 1, 2 e 3 horas do teste de termo resistência (TTR).

Tratamentos	Tempo Zero.	TTR 1h	TTR 2h	TTR 3h
MOTILIDADE				
Controle	36,5±4,12 <sup>b</sup>	34,0±3,94 <sup>c</sup>	30,5±3,69 <sup>b</sup>	27,0±3,50 <sup>b</sup>
Trealose+PSLE	42,0±4,22 <sup>a</sup>	37,5±3,53 <sup>b</sup>	31,5±2,41 <sup>b</sup>	25,0±5,27 <sup>b</sup>
Trealose	43,5±4,12 <sup>a</sup>	42,0±3,50 <sup>a</sup>	38,5±2,41 <sup>a</sup>	34,0±2,11 <sup>a</sup>
VIGOR				
Controle	3,0±0,16 <sup>b</sup>	3,0±0,28 <sup>a</sup>	2,7±0,26 <sup>b</sup>	2,7±0,38 <sup>ab</sup>
Trealose+PSLE	3,3±0,26 <sup>a</sup>	3,0±0,37 <sup>a</sup>	2,7±0,34 <sup>b</sup>	2,5±0,28 <sup>b</sup>
Trealose	3,3±0,26 <sup>a</sup>	3,0±0,21 <sup>a</sup>	3,0±0,16 <sup>a</sup>	2,8±0,26 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna de motilidade ou vigor indicam diferença pelo teste T ( $P<0,05$ ).

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Na avaliação da morfologia espermática não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos quanto ao número de células normais, indicando que os aditivos não promoveram patologias, mantendo as mesmas em níveis normais (controle: 90,2%). A integridade de membrana é essencial para manter a funcionalidade e o perfeito funcionamento das estruturas que compõem o maquinário da célula espermática. No teste hiposmótico, observou-se maior taxa de integridade

de membrana nos espermatozoides tratados com trealose + PSLE (38,6%), que foram superiores ao controle (25,8%), porém não diferiram do grupo tratado com trealose (32,7%).

A maior migração dos espermatozoides após *swim up* foi obtida no grupo trealose + PSLE (4.225.000 espermatozoides/mL), que foi superior ao grupo trealose (3.225.000 espermatozoides/mL), sendo ambos superiores ao grupo controle (1.887.500 espermatozoides/mL), demonstrando que a associação plasma e trealose pode ser interessante, já que o maior potencial de migração das células mimetiza a seleção espermática que ocorre no conduto vaginal da fêmea. Desta forma, seria importante a realização de uma avaliação *in vivo* com sêmen congelado com a associação de trealose + PSLE.

Nas avaliações realizadas após a submissão ao *swim up*, observou-se maior motilidade progressiva nos grupos trealose (85%) e trealose + PSLE (83,5%) que não diferiram entre si e foram superiores ao controle (78%). Também foi observado maior vigor no grupo trealose (3,4) que não diferiu do grupo trealose + PSLE (3,3), mas foi superior ao grupo controle (3,2) (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de células normais, viabilidade de membrana pelo teste hipoosmótico, concentração de células recuperadas, percentual de motilidade e vigor (escala de 1-5), dos espermatozoides congelados sem aditivos (controle) ou com os aditivos tralose ou trealose + plasma seminal equino liofilizado (PSLE), avaliadas após o teste de *swim up*.

GRUPOS	AVALIAÇÃO				
	Células normais	Membranas normais	Células recuperadas / mL de sêmen	Motilidade	Vigor
Controle	90,2 <sup>a</sup>	25,8 <sup>b</sup>	1.887.500 <sup>c</sup>	78,0 <sup>b</sup>	3,2 <sup>b</sup>
Trea+PSLE	94,0 <sup>a</sup>	38,6 <sup>a</sup>	4.225.000 <sup>a</sup>	83,5 <sup>a</sup>	3,3 <sup>ab</sup>
Trealose	91,1 <sup>a</sup>	32,7 <sup>ab</sup>	3.225.000 <sup>b</sup>	85,0 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença pelo teste T ( $P<0,05$ ).

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os fatos reforçam a eficácia da trealose em tornar o meio hipertônico, o que causa desidratação osmótica celular antes do congelamento, e diminui a quantidade de lesão celular, por cristalização de gelo (LIU et al., 1998; STOREY et al., 1998).

Os resultados também indicam as ações de proteínas e fatores antioxidantes do PS, capazes de conservar a integridade funcional da membrana celular e reverter injúrias oriundas de fenômenos como a peroxidação lipídica (MAXWELL et al., 1997; BALERCIA et al., 2004) e choque térmico (BERGER et al., 1985; BARRIOS et al., 2000).

O efeito benéfico do emprego da trealose e do PS individualmente, vem sendo demonstrado através de trabalhos com resultados positivos na melhora dos parâmetros *in vivo* e *in vitro* (AISEN et al., 2002; CASALI, 2014). A associação dos aditivos foi testada pela primeira vez neste estudo, e em função dos parâmetros avaliados, mostrou-se positiva em relação ao grupo controle.

A adição de 100 mM de trealose, ou de 100 mM de trealose + 600 µg de proteína de PSLE, ao meio de congelamento, melhoraram as características funcionais do sêmen ovino após o descongelamento, todavia nas avaliações realizadas após o TTR, o emprego da trealose isoladamente foi mais efetivo do que a associação da trealose com PSLE.

Já na avaliação da migração após submissão ao *swim up*, o tratamento trealose + PSLE foi mais efetivo, proporcionando um maior número de células migradas.

O tratamento com adição de 100 mM de trealose proporcionou maior viabilidade ao sêmen após o descongelamento ao longo do TTR, sendo necessário a avaliação *in vivo* do sêmen ovino congelado com a associação de trealose + PSLE.

## 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, E.G., MEDINA, V.H., VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p.1801–1808. 2002.

BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.** v.21, p.1–7. 2000.

BALERCIA G., MORETTI S., VIGNINI A., MAGAGNINI M., MANTERO F. BOSCARO M., RICIARDO-LAMONICA G., E MAZZANTI L. Role of Nitric Oxide Concentrations on Human Sperm Motility. **Jornal of Andrology**, v.25, n.2. 2004.

BARRIOS, B., PEREZ, J.A., GALLEGOS, M., TATO, A., OSADA, J., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PEREZ JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1531–1537. 2000.

BERGER, T., ECLEGG, E. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock. Initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. **Journal Animal Science**, v.60, p.1295-1302. 1985.

BUCAK, M.N., ATESSAHIN, A., VARISLI, O., YUCE, A.A., TEKIN, N., AKC, A.Y.A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060–1067. 2007.

CASALI, R. **Estratégias para viabilizar o uso de sêmen congelado na inseminação artificial cervical de ovinos**. 2014. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

CHHILLAR, S., SINGH, V.K., KUMAR, R., ATREJA, K.S. Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. **Animal Reproduction Science**. v.135. p1-7. 2012.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p. 2013.

DOMINGUEZ, M.P., FALCINELLI, A., HOZBOR, F., SANCHEZ, E., CESARI, A., ALBERIO, R.H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effects on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v.69, p.564-573. 2008.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**, Sydney: Butterworths, 99p. 1987.

EVANS, G., MCPHIE, C., MAXWELL, W.M.C. The effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Proceed 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction**. v.2, p.74. 2000.

LEAHY, T., MARTI, J.I., EVANS, G., MAXWELL, W.M. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Reproductive Fertility Development**, v.21, p.571-578. 2009.

LEAHY, T., MARTI, J.I., EVANS, G., MAXWELL, W.M. Seasonal Variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.147-153. 2010.

LIU, Z., FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, v.37, p.219-30. 1998.

LOPEZ-SAAZ, A., ORTIZ, N., GALLEGOS, L., GADRE, J.J. Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. **Archives Andrology**. v.44, p.155-164. 2000.

MARTINS, L.T., SANTOS NETO, P.C., GAUDÊNCIO NETO, S., VIEIRA, F.K., RIBEIRO, E.S., MEZZALIRA, A., VIEIRA, A.D. Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction**, v.10, n.4, p.697-703. 2013.

MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**. v.42, p.55-65. 1996.

MAXWELL, W.M.C., WELCH, G.R., JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproductive Fertility Development**. v.8, p.1165-1 178. 1997.

MAXWELL, W.M.C., JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362. 1999.

MAXWELL, W.M.C., GRAAF, S.P., GHIAOUI, R.E., EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Reproduction in domestic ruminants VI**. Proceedings of the Seventh International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, Wellington, New Zealand, 13-17. p.13-38. 2007.

MUIÑO-BLANCO, T., PEREZ-PE, R., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproductive Domestic Animals**, v.43, suppl.4, p.18-31. 2008.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36. 1995.

STOREY, B.T., NOILES, E.E., THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v.37, p.46–58. 1998.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproductive Fertility Development**, v.7, p.871–891. 1995.



## 7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Existem particularidades na espécie ovina que dificultam a disseminação de biotécnicas reprodutivas. Este estudo permitiu um melhor entendimento de alguns dos fatores que podem ser considerados entraves na aplicação das biotécnicas. As alternativas testadas podem facilitar o intercâmbio genético e a produção constante e em larga escala na ovinocultura. O estudo foi dividido em quatro capítulos, que buscaram avaliar a aplicabilidade das diferentes técnicas de inseminação artificial, a busca por melhor sincronização da ovulação, assim como a possibilidade de reutilização de implantes em ovelhas, e finalmente o aumento da eficiência da criopreservação do sêmen ovino.

No estudo 1 pode-se observar que a taxa de prenhez é afetada pela técnica de inseminação e pelo momento da IATF. Em geral, a fertilidade foi aumentou a medida que a inseminação foi realizada mais profunda no conduto cervical. Na técnica transcervical, a taxa de prenhez foi maior nas ovelhas onde o sêmen foi depositado com profundidade superior a 4 cm do orifício da cervix. Porém a deposição de sêmen com essa profundidade foi alcançada em somente em 28,8% das fêmeas Corriedale submetidas a inseminação transcervical, diferente da técnica por laparoscopia, que possibilitou a deposição intrauterina do sêmen em 100% dos animais. O método de IA transcervical consumiu mais tempo, go que tem grande impacto em programas de IATF em larga escala. Todavia, o estudo demonstrou que na impossibilidade de realização da IA por laparoscopia, a inseminação intracervical pode se constituir numa alternativa para manter boas taxas de prenhez. Ainda, em função das diferenças morfológicas na cérvix de ovelhas de distintas raças, sugere a necessidade de se avaliar o método intracervical em ovelhas de outras raças.

O estudo 2 demonstrou que a aplicação de BE no dia 0 do protocolo curto (6 dias) possibilita o emprego de implantes reutilizados, mesmo com a menor concentração de progesterona, sem afetar a taxa de prenhez. Também foi demonstrado que o uso de GnRH no momento da inseminação, não é efetivo para aumentar as taxas de prenhez. Os resultados obtidos neste estudo, poderão ser melhor entendidos quando forem processados os dados de dinâmica folicular por ultrassonografia, bem como os níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona, realizados no estudo 3.

No estudo 4, foi demonstrado o efeito positivo da adição de trealose ou trealose + PSLE na viabilidade do sêmen ovino criopreservado. A adição de trealose mostrou ser o tratamento mais

efetivo na manutenção dos parâmetros seminais, após o descongelamento. Entretanto, a maior migração dos espermatozoides após *swim up*, observada com a adição de Trealose + PSLE, instiga a necessidade de testes *in vivo* para mensurar o efeito do tratamento e remete a necessidade de novas avaliações, que permitam entender estes resultados ou até mesmo otimizar os tratamentos.

Por fim, o estudo possibilitou o avanço no conhecimento de fatores que dificultam a difusão das biotécnicas de reprodução em ovinos, além de criar novas indagações, a serem respondidas em futuros experimentos.

## REFERÊNCIAS

AISEN, E., MEDINA, V., VENTURINO, A. Criopreservation and pos-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801-1808. 2002.

AISEN, E., QUINTANA, M., MEDINA, V., MORELLO, H., VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p. 239–249, 2005.

ÁLVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., KAABI, M., ANEL-LÓPEZ, L., BOIXO, J.C., ANEL, L. ANEL, P. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. **Animal Reproduction Science** 131, p. 153– 159. 2012.

AUDICANA, L., AUGHEY, E., O’SHAUGHNESSY, P. J. Sensitivity of the early luteal phase ovine cervix to prostaglandin E2 (PGE2) and expression of EP3 receptor mRNA. **Research in Veterinary Science**, 64, p.177-1 79. 1998.

BAILEY, J.L., BLODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal Andrology**, v.21, p.1-7.2000.

BALERCIA, G., ARMENI, T., MANTERO, F., PRINCIPATO, G., REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity toward ifferent reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.41, p.13–19. 2003.

BARRET, D.M., BARTLEWSKI, P.M., DUGGAVATHI, R., DAVIES, K.L., HUCHKOWSKY, S.L., EPP, T., RAWLINGS, N.C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v.69, p.827-836. 2008.

BARRIOS B., PÉREZ-PÉ R., GALLEGOS M., TATO A., OSADA J., MUIÑO-BLANCO T., CEBRIÁN-PÉREZ A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on RAM sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1531-1537. 2000.

BARRIOS, B., FERNANDEZ-RUAN, M., MUÑO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, 26, p. 539-549. 2005.

BATERLEWSKI, P.M., CANDAPPA, I.B.R. Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. **Theriogenology**, v.84, p.1594–1602, 2015.

BISCARDE, C.E.A., BICUDO, S.D., CROCOMO, L.F., MAGALHÃES, L.C.O., BITTENCOURT, R.F., FERREIRA, D.O.L., MONTEIRO, C.D., GUSMÃO, A.L. KIYA, C.K., OBA, E. Avaliação de protocolo de curta duração associando benzoato de estradiol e/ou Lecirelina em fêmeas Santa Inês. **Arquivos de Pesquisa Animal**, v.1, n.1, p.13-24. 2012.

BOLAND, M.P., GORDON, I., KELLEHER, D.C. The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI 80996) or progestagen(SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes. **Journal Agriculture Science**. v.91, p.727-730. 1981.

BOSCOS, C.M., SAMARTZI, S.D., ROGGE, A., STEFANAKIS, A., KRAMBOVITIS, E. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. **Theriogenology**, v.58, p.1261-1272. 2002.

BUCAK, M.N., ATESSAHIN, A., VARIS, L.O., YUCE, A., TEKIN, N., AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after the freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067. 2007.

BUCAK, M.N., ATES, A., YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128-134. 2008.

CASALI, R. **Estratégias para viabilizar o uso de sêmen congelado na inseminação artificial cervical de ovinos**. 2014. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

CASALI, R.; ZANFERRARI, L.; PINTO, MLG; TOAZZA, R.; CAMARGO, G.B.; DIAS, G.; MEZZALIRA, M. Inseminação cervical profunda em ovelhas leiteiras sincronizadas com dispositivos intravaginais sem uso de antibióticos (dados parciais). **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz de Iguaçu: 2016. 192-193p.

CSEH, V.; FAIGL, G.S., AMIRIDIS, S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p.187-192. 2012.

CHILLAR, S., SINGH, V.K., KUMAR, R., ATREJA, K.S. Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. **Animal Reproduction Science**, v.135, p.1-7. 2012.

EL-HAJJ GHAOUI, R., THOMSON, P.C., EVANS, G., MAXWELL, W.M. The origin of membrane vesicles in ram seminal plasma. **Reproduction Domestic Animals**, v.41, p.98-105. 2006.

EL-HAJJ GHAOUI, R., GILLAN, L., THONSON, P.C., EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal Andrology**, v.28, p.109-122. 2007.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Salomon's Artificial **Insemination of Sheep and Goats**, Sydney: Butterworths, 99p. 1987.

FONSECA, J.F., ZAMBRINIA, F.N., ALVIMB, G.P., PEIXOTO, M.G.C.D., VERNEQUE , R.S., VIANA, J.H.M. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. **Small Ruminant Research**, v.111, p.96-99. 2013.

FONSECA, J.F., SOUZA-FABJAN, J.M.G., OLIVEIRA, M.E.F., LEITE, C.R., NASCIMENTO, PENIDO, P.M.P., BRANDÃO, F.Z. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.86, p.144-151. 2016.

FUKUI, Y., ROBERTS, E. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, v.10, p.381–393. 1978.

GILLIAN, L., MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal Reproductive. Fertility**. Suppl., v.54, p.271-283. 1999.

GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v.41, p.1151-1162. 1994.

GORDON, I. **Fixed-time sheep artificial insemination**. In “**Controlled Breeding in Farm Animals**”. (Ed. I. Gordon.), p.197-208. (Pergamon Press: Oxford,UK.). 1983.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., SHARPE, P., BUCKRELL, B.C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v.33, p.1231-43. 1990.

JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., SALBEGO, C.G., WALD, V.B., HORN, A.P. E MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, 63, p. 2053-2062. 2005.

KERSHAW, C.M., KHALID, M., MCGOWAN, M.R., SUKANYA LEETHONGDEE, K.I., WAX, G. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225-1235. 2005.

LEAHY, T., MARTIN, J.I., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.147-153. 2010.

LIU, Z., FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, v.37, p.219-30, 1998.

LOPEZ-PÉREZ, A., PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 for 24 hours. **Theriogenology**, v.77, p.395-399. 2012.

LOPYRIN, A.I. **Biology of Reproduction in Sheep**. Kolos, Moscow, win Russianx, p.1320, 1971.

MALO, C., GIL, L., GONZALEZ, N., CANO, R., DE BLAS, I., ESPINOSA, E. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. **Cryobiology**, v.61, p.17-21. 2010.

MARTEMUCCI, G., D'ALESSANDRO A.G. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined shortterm GnRH, PGF2 and estradiol benzoate treatments. **Small Ruminant Research**, v.93, p.41-47. 2010.

MARTI, E., MARA, L., MARTI, J.I., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.67, p.1446-1454, 2007.

MARTINS, L.T., SANTOS NETO, P.C., GAUDÊNCIO NETO, S., BERTOLINI, M., VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. **Ciência Rural**, v. 40, p. 389-395. 2010.

MARTINS, L.T., SANTOS NETO, P.C., GAUDÊNCIO NETO, S., VIEIRA, F.K., RIBEIRO, E.S., MEZZALIRA, A., VIEIRA, A.D. Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction**, v.10, n.4, p.697-703. 2013.

MAXWELL, W. M. C., WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.

MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., MORTIMER, S.T., GILLAN, L., GELLATLY, E.S., MCPHIE, C.A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproductive Fertility Development**, v.11, p.123-126. 1999.

MENARD, M., NAUC, V., LAZURE, C., VAILLANCOURT, D. E MANJUNATH, P. Novel Purification Method for Mammalian Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Reveals the Presence of a Novel Member of This Family of Protein in Stallion Seminal Fluid. **Molecular reproduction and development**, v.66, p.349-357. 2003.

MENCHACA, A., RUBIANES, C.E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.403–413. 2004.

MEIKLE, A., FORSBERG, M., GARÓFALO E.G., CARLSSON M.A., LUNDEHEIMC, N., RUBIANES, E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrous ewes after treatment with estradiol. **Animal Reproduction Science**, v.67, p. 79-90. 2001.

MORTIMER, S.T., MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.127, p.285-291. 2004.

MUIÑO-BLANCO, T., PEREZ-PE, R., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction Domestic Animals**. v.43, suppl.4, p.18-31. 2008.

NAING, S.W., WAHID, H., MOHD AZAM, K., ROSNINA, Y., ZUKI, A.B., KAZHAL, S., BUKAR, M.M., THEIN, M., KYAW, T., SAN, M.M. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.122, p. 23-28. 2010.

O'MEARA, C.M., DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., DUFFY, P., FAIR, S., EVANS, A.C.O. Lonergan, P. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. **Theriogenology**, v.67, p.1262-68. 2007.

PIERSON, J.T., BALDASSARRE, H., KEEFER, C.L., DOWNEY, B.R. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. **Theriogenology**, v.60, p.397-406. 2003.

RICHARDSON, L., HANRAHAN, J.P., DONOVAN, A.; MARTÍ, J.I., FAIR, S.; EVANS, A.C.O., LONERGAN, P. Effect of site of deposition on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v.131, p.160-164. 2012.

RABASSA, V.R., TABELEÃO, V.C., PFEIFER, L.F.M., SCHNEIDER, A., ZIGUER, E.A., SCHLOSSER, E., SEVERO, N.C., DEL PINO, F.A.B., CORRÊA, M.N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, p.127-133. 2007.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**. v.37, p.185–249. 1995a.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1–36. 1995b.

STOREY, B.T., NOILES, E.E., THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v.37, p.46–58. 1998.

THERIEN, I., BERGERON, A., BOUSQUET, D., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Molecular Reproductive Development**. v.71, p.97-106. 2005.

UNGERFELD, R., RUBIANES, E. Effectiveness of short-term progestogen priming for the eCG induction of fertile oestrous in ewes during late seasonal anoestrus. **Animal Science**, v.68, p.349-353. 1999.

VADNAIS, M.L., ROBERTS, K.P. Effect of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. **Journal Andrology**, v.28, p.416-422. 2007.

VILARIÑO, M., RUBIANES, E., VANLIER, E., MENCHACA, A. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICOs). **Small Ruminant Research**. v.91, p.219-224. 2010.

VILARIÑO, M., RUBIANES, E., MENCHACA, A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term protocol for time artificial insemination in goats. **Theriogenology**, v.75, p.1195-1200. 2011.

VILARIÑO, M., RUBIANES, E., MENCHACA, A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed- time artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v.79, p.206-210. 2013.

VIÑOLES, C., MEIKLE, A., FORSBERG, M., RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**, v.51, p.1351-1361.1999.

VIÑOLES, C., FORSBERG, M., BANCHERO, G., RUBIANES, E. Effect of long term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.55, p.993-04. 2001.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen .**Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492. 2000.

WULSTER-RADCLIFF, M.C., LEWIS, G.S. 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**, v.58, p.1361-1371. 2002.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.S., WANG, G., LEWIS, S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v.62, p.990–1002. 2004.