UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR RETRAÇÃO CERVICAL EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Autor: Caio Tacito Gomes Alvares
Orientador: Prof. DSc. Jurandir Ferreira da Cruz

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março de 2015

CAIO TACITO GOMES ALVARES

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR RETRAÇÃO CERVICAL EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. DSc. Jurandir Ferreira da Cruz

Co-orientadora: Profª. DSc. Carla Cristina Romano

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março de 2015

636.0824 Alvares, Caio Tacito Gomes.
A472i Inseminação artificial por retração cervical em ovelhas da raça Santa Inês. / Caio Tacito Gomes Alvares. – Itapetinga-BA: UESB, 2015.

93f.

Tese do Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - C*ampus* de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Jurandir Ferreira da Cruz e coorientação da Profª. D.Sc. Carla Cristina Romano.

1. Inseminação artificial em ovelhas. 2. Inseminação artificial em ovelhas – Aplicador expansor - Cérvice. 3. Ovelhas – Fisiologia reprodutiva - Histologia. 4. Ovelhas – Citocinas e reprodução. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, C*ampus* de Itapetinga. II. Cruz, Jurandir Ferreira da. III. Romano, Carla Cristina. IV. Título.

CDD(21): 636.0824

Catalogação na Fonte:
Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Inseminação artificial em ovelhas
2. Inseminação artificial em ovelhas – Aplicador expansor - Cérvice
3. Ovelhas – Fisiologia reprodutiva - Histologia
4. Ovelhas – Citocinas e reprodução

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-*BA*

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Inseminação artificial por retração cervical em ovelhas da raça Santa Inês".

Autor (a): Caio Tacito Gomes Alvares
Orientador (a): Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Cruz
Co-orientador (a): Profª. Drª. Carla Cristina Romano

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Cruz - UESB

Prof. Dr. Antônio Jorge Del Rei – UESB

Profª. Drª. Carla Cristina Romano – UESC

Prof. Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro - UESB

Prof. Dr. Manoel Luiz Ferreira -UESC

Data de realização: 02 de março de 2015.

"A gente vive em qualquer lugar, a vida está cá dentro e não lá fora. Ser homem entre os homens e permanecê-lo em quaisquer desgraças, para sempre, sem ficar triste e abatido – eis em que consiste a vida e seu objetivo."

Fiódor Dostoiévski

MODUS VIVENDI

A gente vive aqui
(ou tem que viver)
E aqui falta muito. Falta tudo.
Parece uma escada só p´ra todo mundo.
E todo mundo quer subir.
Todos juntos numa escada só.
Falta amor.
Amor comum. Daqueles simples.
E respeito.
Respeito à condição humana dos semelhantes
e, por semelhante, à nossa própria.
Tem-se que pagar.
Pagar por tudo.
É o preço.
Preço da vida.
O peso do preço
o preço da pressa
a pressa da presa.
A pressa é o preço
e a gente é a presa
presa de gente que tem pressa
da pressa de gente que tem preço,
preço da presa que tem pressa
p´ra ser gente
e pagar depressa o preço
da gente que tem pressa
que o preço leva a ser presa.

Luiz Alvares, 1974 (*in memorian*)

Ao homem do campo

Com seu amor simples e respeito humano, apesar do *modus vivendi* do mundo...

Na expectativa de que o ideal e o conhecimento abordados aqui tenham sentido e alcancem sua realidade, pois, com habilidade e paixão, exercerás o dom de multiplicar o *pão*.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Bianca e meus filhos, Igor e Artur. *FAMÍLIA*... A Fortaleza que me renova o sentido da Vida.

Ao (i) Amigo (ii) Parceiro (iii) Orientador, Jurandir Cruz, que exerceu com harmonia as três funções durante esses anos, confiando sempre em nosso sucesso.

À Co-orientadora Carla Romano, pelo genial apoio de nos conduzir nas etapas mais ousadas dos estudos.

Aos amigos Jorge Del Rei, Claudio Coutinho, José Augusto Carvalho e Manoel Luiz, o alicerce dessa carreira acadêmica.

Ao Mestre, Armando Leal do Norte. Os rumos da Vida são sinuosos, mas os Ensinamentos, o Respeito e a Admiração são eternos...

À Fazenda CAIMBI, onde o sonho começou...

Ao colega Paulo Carneiro, pela valorização e significativa contribuição aos rumos de nosso estudo.

Ao colega Felipe Zandonadi Brandão, pela sua disponibilidade e apoio técnico no Laboratório de Reprodução Animal da UFF/Niterói, RJ.

Ao colega Gustavo Almeida e empresa *Alta Genetics*, pela parceria que originou este projeto.

Ao colega André Herklotz e empresa *Sinapse Biotecnologia*, por viabilizar a realização de nossos estudos com Citocinas.

À Fapesb, por acreditar na potencialidade de nosso projeto de pesquisa.

À equipe do LRCO, UESB Vitória da Conquista por todo apoio ao longo dos trabalhos: M.V. Dalmar, Gil, Milton, Fabrine.

À estimada Profª. Cláudia Cruz, pela paciência e compreensão para com os momentos intensos de trabalho do orientador.

Aos *símbolos* de amparo e revigoração ao longo destes anos: *Mendes & Zeus, Logan & Piotr, Lora & Leo, Binho & Mi, Carmona & Mônica, Vetererê20 & Anexo.*

E, por fim, um agradecimento muito especial à equipe da FAZENDA ALMADA: vocês acreditaram e apoiaram a ideia de que podemos recuperar o nosso papel difusor, por isso, *juntos*, resgatamos nossa *dignidade*... Aos estimados Sergio, Miranei, Roberto, Washington, Sidnei, Martins, Gilson, Jonilson, Gabson, Adauto, João, Gua, Dudé, Pedro Calisto e vigilantes, “muito obrigado”!

BIOGRAFIA

Caio Tacito Gomes Alvares nasceu em 1975, filho de Luiz Carlos da Silva Alvares (*in memorian*) e Valentina Gomes Alvares (*in memorian*), foi educado e instruído por Mario Durra, Demostina da Silva Alvares e Laura da Silva Alvares (*in memorian*), criado e formado na cidade de Niterói, Médico Veterinário diplomado pela Universidade Federal Fluminense (UFF), em 1999. Casado com Bianca Mendes Maciel coordenou junto ao INCRA a implantação da pecuária leiteira em Assentamentos do sul do Mato Grosso entre 1999 e 2000; obteve especialização em Julgamento de Raças Zebuínas (FAZU, MG, 2001) e Gestão Agroindustrial (UFLA, MG, 2003); atuou na pecuária do extremo sul da Bahia, onde participou do projeto "Bovino Composto Red Norte" e produziu o programa de Rádio "Progresso no Campo"; iniciou atuação em ovinocultura de corte com a implantação da Fazenda Caimbi, Ilhéus, BA (2001), ingressando na Docência na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em 2003; em 2005 concluiu o Mestrado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB); coordenou o "PIBO" – Programa de Implantação do Banco de Ovinos no sul da Bahia desde 2006 até ingressar no Doutorado em Produção de Ruminantes, na UESB, em 2011.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS viii
LISTA DE TABELAS xi
RESUMO xiii
ABSTRACT xiv
I - REFERENCIAL TEÓRICO 15
1 INTRODUÇÃO 15
2 OVINOCULTURA E A RAÇA SANTA INÊS 16
3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS 17
3.1 Técnicas e instrumentos de IA em ovinos 18
3.1.1 Vaginal 18
3.1.2 Cervical 19
3.1.3 Transcervical 19
3.1.4 Laparoscopia 22
3.2 Implicações fisiopatológicas 23
4 TECNOLOGIA DO SÊMEN 24
4.1 Transporte, metabolismo e fertilidade da célula espermática de ovinos ... 25
4.2 Limitações fisiológicas do espermatozoide com criopreservação 26
5 CITOCINAS E REPRODUÇÃO EM FÊMEAS 27
5.1 Ciclicidade reprodutiva 28
5.2 Reconhecimento materno do embrião 30
5.3 Implantação 31
Referências 33
II - OBJETIVOS GERAIS 39
III - CAPÍTULO I – Comportamento, parâmetros endócrinos e histológicos de ovelhas Santa Inês sincronizadas e submetidas à técnica de inseminação artificial por retração cervical 40
Resumo 40
Abstract 41
Introdução 42
Material e métodos 43
Resultados 47
Discussão 52

Conclusões 55
Referências 56
IV - CAPÍTULO II – Viabilidade técnica da inseminação artificial por retração cervical com sêmen congelado comercial em ovelhas Santa Inês 60
Resumo 60
Abstract 61
Introdução 62
Material e métodos 63
Resultados e discussão 67
Conclusões 72
Referências 73
V CAPÍTULO III – Perfil sérico de citocinas IFNγ e IL10 em ovelhas Santa Inês submetidas à inseminação artificial por retração cervical 77
Resumo 77
Abstract 78
Introdução 79
Material e métodos 80
Resultados e discussão 83
Conclusões 88
Referências 88
VI CONSIDERAÇÕES FINAIS 92
ANEXO - Comprovação de submissão do Artigo científico "Behavior, endocrine and histological parameters of synchronized Santa Inês ewes submitted to artificial insemination by cervical retraction" para o periódico *Small Ruminant Research* 93

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Página

Figura 1	Inseminação intrauterina por retração cervical com uso do aplicador expansor ovino®.	22
Figura 2	Regurgitação do conteúdo ruminal de ovelha submetida à laparoscopia em posição céfalo-declive de Trendelemburg.	24
Figura 3	Ilustração da lise do corpo lúteo (CL) a partir de resposta inflamatória provocada pelo aumento da secreção de $PGF_2\alpha$	29
Figura 4	Envolvimento de citocinas em duas fases reprodutivas distintas em ruminantes. Durante o reconhecimento materno (A), o interferon-tau (IFNτ) produzido pelo embrião atua no endométrio promovendo a transcrição de genes para receptores de progesterona (1), inibição direta de receptores de estrógeno (2) e ocitocina (3) e produção de inibidores de enzimas necessárias à síntese de PGF2α (4). Com o avanço da gestação (B), há aumento progressivo de citocinas anti-inflamatórias Th2 em contraste com diminuição de citocinas pró-inflamatórias Th1; ao redor da vascularização das carúnculas, ocorre acúmulo do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), também como medida de imunotolerância materno-fetal.	31

CAPÍTULO I

		Página
Figura 1	À esquerda: palheta 0,25mL (A), aplicador de sêmen (B), mandril para transposição cervical (C) e êmbolo para deposição da dose inseminante (D); à direita, realização da inseminação artificial transcervical com retração da cérvice em ovelhas em estação.	45
Figura 2	À esquerda: palheta 0,25mL (A), aplicador de sêmen (B), mandril para transposição cervical (C) e êmbolo para deposição da dose inseminante (D); à direita, realização da inseminação artificial transcervical com retração da cérvice em ovelhas em estação.	47
Figura 3	Níveis séricos de 17β estradiol em ovelhas sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP) e submetidas à técnica de IA por retração cervical no dia zero (D0). Grupo controle (GC) composto por ovelhas ao estro natural e sem IA. $P < 0,05$ pelo teste SNK.	49
Figura 4	Níveis séricos de progesterona em ovelhas sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP) e submetidas à técnica de IA por retração cervical no dia zero (D0). Grupo controle (GC) composto por ovelhas ao estro natural e sem IA. ($P>0,05$ pelo teste SNK).	50
Figura 5	Histologia de cérvices de ovelhas submetidas à técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC) em diferentes momentos (HE, microscopia óptica, à esquerda: aumento de 100x, barra 100µm; à direita: 400x, 50µm). A) sem IRC: ausência de alterações teciduais; B) 24h pós-IRC: focos de hemorragia intensa (setas); presença de células inflamatórias (neutrófilos) e edema/degeneração celular (área circundada); C) 72h pós-IRC: poucas áreas com presença de linfócitos (plasmócitos, área pontilhada) e reorganização tecidual.	

CAPÍTULO II

		Página
Figura 1	Níveis séricos de progesterona de ovelhas Santa Inês submetidas à monta natural (MN), IA por retração cervical (IRC) ou laparoscópica (ILA) e diagnosticadas vazias ou gestantes (D_{17}, P <0,05 pelo Teste SNK).	71

CAPÍTULO III

		Página
Figura 1	Níveis séricos de progesterona de ovelhas Santa Inês vazias, gestantes ou com perda embrionária (PE), independentemente da técnica reprodutiva utilizada. * P<0,05 pelo teste SNK.	84
Figura 2	Níveis séricos de interferon gama (IFN-g) e interleucina 10 (IL-10) de ovelhas Santa Inês submetidas à inseminação artificial por retração cervical (IRC, n=36), laparoscópica (ILA, n=32) ou monta natural (MN, n=22). Todas as amostras analisadas em duplicata pela técnica de ELISA. P>0,01 pelo teste Tuckey.	85
Figura 3	Níveis séricos de interferon gama (IFN-g) e interleucina 10 (IL-10) de ovelhas Santa Inês após inseminação artificial por retração cervical (36, ■), monta natural (22, ■) ou IA por laparoscopia (32, □). Todas as amostras analisadas em duplicata pela técnica de ELISA P > 0,01 pelo teste Tuckey.	86
Figura 4	Figura 4. Níveis séricos de interferon gama (IFN-g) e interleucina 10 (IL-10) de ovelhas Santa Inês gestantes (n=34), com perda embrionária (PE, n=23) ou vazias (n=33) após inseminação artificial com retração da cérvice, por laparoscopia ou monta natural. Todas as amostras analisadas em duplicata pela técnica de ELISA. * P < 0,01 pelo teste Tuckey.	87

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Página

Tabela 1	Porcentagem de partos de ovelhas por local de deposição do sêmen utilizando técnica transcervical (Adaptado de Halbert et al., 1990b).	20
Tabela 2	Sucesso da penetração cervical em função do período de serviço da ovelha e experiência do inseminador. Adaptado de Buckrell et al. (1994).	21
Tabela 3	Escore de lesão tecidual na cérvice baseado na penetração da pipeta ou na secção cervical. Adaptado de Campbell et al. (1996).	23
Tabela 4	Número de espermatozoides recuperados do trato reprodutivo de ovelhas em diferentes horas após acasalamento. Adaptado de Hawk (1983).	25
Tabela 5	Metabolismo (µmoles/10^8 células) dos espermatozoides ovinos incubados em fluido de tuba uterina em diferentes diluições. Adaptado de Restall (1970)	26

CAPÍTULO I

		Página
Tabela 1	Parâmetros comportamentais de ovelhas Santa Inês sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP) e submetidas à técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC)	48
Tabela 2	Desempenho da técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC) em ovelhas Santa Inês sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP)	50

CAPÍTULO II

		Página
Tabela 1	Valores de motilidade progressiva (MP), vigor e concentração espermática ao descongelamento e após teste de termorresistência (TTR) de partidas do sêmen de origem comercial	65
Tabela 2	Tempo para penetração da cérvice (TPC), tempo para inseminação artificial por retração cervical (TIRC), taxa de deposição do sêmen e intensidade de reação em ovelhas Santa Inês	67
Tabela 3	Taxas de não-retorno ao estro (NRE), gestação, perda embrionária (PE) e de fertilidade em ovelhas Santa Inês submetidas a diferentes técnicas de inseminação artificial ou monta natural	69

RESUMO

ALVARES, C.T.G. **Inseminação artificial por retração cervical em ovelhas da raça Santa Inês.** Itapetinga, BA: UESB, 2015. 93p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se avaliar a viabilidade da técnica de inseminação artificial transcervical com retração da cérvice (IRC) em ovelhas da raça Santa Inês, por meio de parâmetros comportamentais, endócrinos, histológicos e imunológicos. Para tanto foram realizados três estudos sequenciais. No estudo I, utilizando ovelhas sincronizadas com protocolos hormonais à base de prostaglandina ou progestágeno, avaliou-se o efeito da técnica IRC no comportamento, níveis hormonais e na histologia cervical. A IRC, independentemente do protocolo hormonal, possibilitou deposição intrauterina de sêmen em 83,5% das ovelhas. Apenas 9,3% das ovelhas apresentam reação forte a IRC e foi verificada intensa reação inflamatória no epitélio cervical 24 horas pós-IRC, quadro que foi atenuado às 72 horas, com reorganização tecidual. No estudo II, foi avaliado o desempenho da IRC com uso de sêmen congelado disponível comercialmente. Foram comparadas duas técnicas de inseminação (com retração cervical - IRC ou por laparoscopia - IAL) e dois tipos de sêmen (fresco ou congelado). Os níveis séricos de progesterona (P_4) foram mensurados e comparados com ovelhas cobertas naturalmente (MN). Houve similaridade ($P > 0,05$) entre as técnicas de IA para não-retorno ao estro (35,0% vs 35,3%), perda embrionária (19% e 8,5), fertilidade com sêmen fresco (50% e 50%) e com sêmen congelado (17,5% e 20,4%), respectivamente. Também não houve diferença quanto aos níveis de P_4. No estudo III, foram usados os mesmos métodos de reprodução do Estudo II para avaliar os níveis séricos de interferon gama (IFNγ) e interleucina 10 (IL10). As ovelhas foram classificadas como gestantes, vazias ou com perda embrionária. Foram coletadas amostras de sangue em D_0, D_3, D_5, D_{12} e D_{17} para quantificação de progesterona, IFNγ e IL10 (D_0 = dia da inseminação/cobertura). Os níveis de progesterona foram similares, exceto pela redução no D_{17} nas ovelhas vazias ($P<0,05$). Em função do método de reprodução utilizado, não houve diferença entre os grupos para IFNγ e IL10 em nenhum momento avaliado ($P > 0,05$), com médias de 642,1, 713,2 e 741,2 pg/mL para IFNγ e 667,1, 616,8 e 721,1 pg/mL para IL10 nas ovelhas submetidas à IRC, IAL e MN, respectivamente. As ovelhas com perda embrionária apresentaram menores níveis séricos de IFNγ e IL10 que ovelhas gestantes e vazias, independentemente do método reprodutivo utilizado, com médias de IFNγ 769,1, 555,7 e 714,9 pg/mL, e de IL10 713,8, 578,7 e 699,3 pg/mL, na mesma ordem ($P<0,01$). A inseminação artificial por retração cervical com uso do aplicador expansor e contenção em estação apresenta praticidade, não interfere no bem-estar nem compromete o perfil endócrino e imunológico de ovelhas Santa Inês.

Palavras-chave: aplicador expansor, cérvice, citocinas, fisiologia reprodutiva, histologia.

---

* Orientador: Jurandir Ferreira da Cruz, DSc. UESB; Co-orientadora: Carla Cristina Romano, DSc UESC

ABSTRACT

ALVARES, C.T.G. **Artificial insemination by cervical retraction in Santa Inês breed ewes.** Itapetinga, BA: UESB, 2015. 93p. Thesis. (Doctoral Thesis – Animal Science – Ruminant Production).*

This study aimed to evaluate the feasibility of transcervical artificial insemination by cervical retraction (RCI) in Santa Inês ewes, through behavioral, endocrine, histological and immunological parameters. Therefore, we carried out three sequential studies. In study I, ewes were synchronized with hormone prostaglandin- or progestagen- based protocols for timed RCI and behavior, hormonal levels and cervical histology were evaluated. Regardless of hormonal protocol, RCI allowed intrauterine deposition of semen in 83.5% of the ewes; only 9.3% of the ewes revealed a strong reaction to RCI; intense inflammatory reaction was observed in cervical epithelium 24 hours after RCI, but the inflammation decreased at 72 hours, with tissue reorganization. In study II, we evaluated the performance of the RCI using frozen-thawed semen commercially available; two insemination techniques (with cervical retraction - RCI or laparoscopy - LAI) and two types of semen (fresh or frozen) were compared; serum levels of progesterone (P_4) were measured and compared with naturally mated ewes (NM). The AI techniques were similar for non-return to estrus (35.0% vs 35.3%), embryonic loss (19% and 8.5), fertility with fresh semen (50% and 50%) and with semen frozen (17.5% and 20.4%), respectively. There was also no difference in the levels of P_4. In Study III, the same methods of Study II were used to measure serum levels of interferon gamma (IFNγ) and interleukin 10 (IL10). The ewes were classified as pregnant, non pregnant or with embryonic loss. Blood samples were collected on D_0, D_3, D_5, D_{12} and D_{17} for quantification of progesterone, IFNγ and IL-10 (D_0 = day of insemination / mating); Progesterone levels were similar, except for the decrease in non pregnant ewes at D_{17} ($P < 0.05$). Regarding to reproductive method used, there was no difference between groups for IFNγ and IL-10 in any time, the averages were 642.1, 713.2 and 741.2 pg/mL for IFNγ and 667.1, 616.8 and 721.1 pg/ml for IL-10 in ewes submitted to RCI, LAI and NM, respectively. The ewes with embryonic loss had lower serum levels of IFNγ and IL-10 than pregnant and non pregnant ewes, regardless of reproductive method, the averages were 769.1, 555.7 and 714.9 pg/mL for IFNγ and 713.8, 578.7 and 699.3 pg/ml for IL10, in the same order ($P < 0.01$). In conclusion, artificial insemination by cervical retraction using the expander catheter catheter in ewes restrained in station provides easy implementation, does not interfere in the welfare or compromise the endocrine and immunological profile of Santa Inês ewes.

Keywords: cervix, cytokines, expander catheter, histology, reproductive physiology.

---

* Advisor: Jurandir Ferreira da Cruz, DSc. UESB; Co-advisor: Carla Crisitna Romano, DSc. UESC

I REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é destaque no cenário internacional como potência do Agronegócio, sendo um dos líderes mundiais de *commodities* alimentícias. Contudo, tal realidade é baseada em uma atividade agropecuária empresarial e de larga escala, focada em definidos objetivos de lucratividade, apesar de pequenas e médias unidades de produção prevalecerem em todas as regiões do país. Diante deste contraste, a inclusão social, mais que um argumento político, passa a ser uma necessidade de sobrevivência.

Neste cenário, a ovinocultura apresenta-se como uma atividade viável, principalmente por permitir que o êxito na produção seja alcançado por pequenos e médios produtores, bem como pela agricultura familiar, numa real possibilidade de promoção de qualidade de vida do homem do campo.

Para tanto, são necessárias ações coordenadas e abrangentes que possibilitem a organização e qualificação do setor. Ações no melhoramento genético e incremento da produtividade, associados à elevação da demanda pelos produtos gerados, pode tornar a atividade potencialmente sustentável.

A disseminação do material genético melhorado pode ser alcançada utilizando-se biotécnicas de reprodução animal, como a inseminação artificial (IA). A IA permite que reprodutores de elevado padrão genético possam servir a um número superior de fêmeas por estação reprodutiva, quando comparada com a monta natural, otimizando o uso desse animal. Adicionalmente, os programas de avaliação genética dependem da IA para que os reprodutores possam ser comparados em diferentes rebanhos via teste de progênie.

Na espécie ovina, essa biotécnica ainda apresenta entraves. Na fêmea, a disposição anatômica dos anéis cervicais dificulta o acesso intrauterino dos aplicadores convencionais de sêmen, diminuindo a possibilidade de fertilização. No macho, a sensibilidade da célula espermática ao processo de criopreservação reduz sua capacidade fecundante quando submetidos ao processo de congelação-descongelação.

Considerando estes pontos críticos, quando o sêmen utilizado está sob a forma congelada, a técnica que apresenta os melhores resultados é a IA por laparoscopia, contudo, é onerosa e demanda mão de obra especializada.

Neste sentido, tem sido utilizada a técnica de inseminação artificial transcervical por retração da cérvice (IRC). Esta permite maior alinhamento dos anéis cervicais, facilitando sua transposição e a deposição intrauterina do sêmen. Porém, devido a variedade de resultados de fertilidade alcançados, a despeito da sua potencialidade, esta técnica merece mais investigação quanto à sua viabilidade em rebanhos ovinos.

Com isso, este estudo está dividido em três capítulos: no Capítulo I, a técnica IRC é avaliada quanto a sua influência em parâmetros comportamentais, endócrinos e histológicos das ovelhas. No Capítulo II, são avaliados os desempenhos reprodutivos da IRC com utilização de sêmen congelado disponível no mercado e, no Capítulo III, a IRC é investigada quanto a possíveis influências no perfil sérico de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

2 OVINOCULTURA E A RAÇA SANTA INÊS

A ovinocultura apresenta grandes variações de cenário em todo o mundo, desde a presença de rebanhos historicamente populosos na Ásia até os criteriosamente selecionados para produção de carne na Europa. O consumo de carne ovina *per capita* é amplamente variado entre continentes, desde 17,0kg na Oceania até 0,7kg na América do Norte (Sañudo et al., 2013).

No Brasil, a produção ovina é presente em todas as regiões, porém com intensidades diferentes, sob forte influência de fatores ambientais, como cobertura vegetal, precipitação, temperatura, altitude, umidade relativa e radiação solar (Hermuche et al., 2013).

A região Nordeste comporta 9.325.885 ovinos, 55,5% do rebanho nacional (IBGE, 2012). No entanto, com uma criação fortemente caracterizada pela agricultura familiar e subsistência, além de dificuldades estruturais da atividade, como escala e regularidade de oferta de animais para comercialização, o abastecimento de carne ovina ao mercado consumidor depende da importação de outros países (Morais, 2000; Viana, 2008). Associada a sistemas produtivos adequados, uma proposta de mudança deste cenário

passa pela adoção de critérios de seleção em rebanhos que resultem no incremento da produtividade e progresso genético de raças de corte.

Neste contexto, a raça Santa Inês se tornou uma alternativa interessante de raça materna para a melhora da eficiência dos sistemas de produção de cordeiros, devido a características como rusticidade, baixa estacionalidade reprodutiva, velocidade de ganho de peso e resistência a helmintos (Sousa et al., 2003, Simplício e Santos, 2005; Costa Jr. et al., 2006).

No entanto, apesar da nítida participação da raça Santa Inês nos rebanhos ovinos, o processo de seleção realizado de forma empírica ameaça o progresso genético real. Critérios como tipo e tamanho, erroneamente valorizados pelos criadores no mercado de reprodutores, além dos eventos de introgressão por cruzamento com raças exóticas, podem comprometer o avanço na eficiência reprodutiva dos animais, bem como torná-los mais exigentes quanto à nutrição (Carneiro et al., 2006; Costa Jr et al., 2006; Paiva e Pimentel, 2008). Assim, ainda se faz necessária a implantação bem sucedida de um programa oficial de melhoramento genético que consiga ser abrangente e especialmente eficaz na formação e ampliação de rebanhos multiplicadores, que difundem o progresso genético alcançado pela raça.

3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica da reprodução assistida que consiste na aplicação do sêmen no aparelho reprodutor da fêmea por meio de instrumentos. Visa o melhor aproveitamento de machos previamente selecionados quanto às suas características genéticas e andrológicas. Em ovinos, os primeiros registros desta técnica datam de 1939, ocorrendo um número relativamente elevado de inseminações ao longo das décadas de 1940 e 1950 (Oliveira e Fonseca, 2013).

Fischer Neto (2009) cita como vantagens da IA i) direcionar a aquisição de reprodutores geneticamente melhoradores, ii) diminuir a necessidade de maior número de machos para realização da mesma estação reprodutiva, iii) proporcionar agregação genética em maior número de fêmeas comparada a monta natural, iv) viabilizar testes de progênie, v) prevenir transmissão de doenças venéreas e vi) padronização e valorização dos cordeiros.

A utilização da IA com sêmen líquido, isto é, fresco ou refrigerado, permite que sejam alcançados resultados satisfatórios de fertilidade. A possibilidade de popularização da técnica é maior, por demandar instrumentos menos onerosos para deposição no trato genital feminino. Contudo, limita-se pela quantidade de doses por ejaculado e dificuldade de acesso a animais superiores (Donovan et al., 2004).

Com relação ao sêmen congelado, diferentemente de outras espécies domésticas, em que a IA é praticada amplamente com relativo sucesso, como em bovinos, na espécie ovina existem entraves anátomo-fisiológicos que limitam a sua popularização (Bicudo et al., 2005). A cérvice da ovelha é longa, tubular e fibrosa, altamente tortuosa, com quatro a sete anéis desalinhados, que promovem uma barreira física contra contaminações externas. Estes entraves, mesmo em condição de estro, torna difícil a transposição desta estrutura, limitando a deposição intrauterina do sêmen (Kershaw et al., 2005).

Por outro lado, o espermatozoide ovino é mais susceptível a injúrias no processo de criopreservação, devido a maior sensibilidade de sua membrana à congelação, tendo consequências na atividade respiratória, criocapacitação e interação com células da tuba uterina, diminuindo sua capacidade fecundante (Salamon e Maxwell, 2000).

3.1 Técnicas e instrumentos de IA em ovinos

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

3.1.1 Vaginal

Trata-se da técnica mais simples, em que se realiza a deposição do sêmen na vagina da ovelha o mais profundo possível, sem a intenção de localizar e transpassar a cérvice. Utiliza-se preferencialmente sêmen fresco ou resfriado com elevada concentração espermática, entre 200 e 400 milhões de espermatozoides (sptz) por dose, com taxas de prenhez relatadas entre 40% e 65% (Ferra e Sereno, 2006; Oliveira e Fonseca, 2013).

3.1.2 Cervical

Esta técnica visa à deposição do sêmen no interior da cérvice, na parte superficial, média ou profunda, de acordo com a quantidade de anéis cervicais transpassados. Portanto, é diretamente influenciada por fatores como momento do estro, idade e ordem de parição. É bem difundida por ser rápida e relativamente fácil, de pouca manipulação (Windsor, 1995).

Uma forte limitação do uso de sêmen congelado com esta técnica foi demonstrada por Cardoso et al. (2009) que ao compararem IA cervical com sêmen fresco *versus* congelado em fêmeas Santa Inês sincronizadas, alcançaram taxas de gestação de 58,8% *versus* 14,7% respectivamente, tornando inviável economicamente o uso de sêmen congelado. Da mesma forma, Sánchez-Partida et al. (1999) haviam demonstrado tal limitação desta combinação IA cervical e sêmen congelado, com taxas de prenhez aos 65 dias entre 10% e 20%.

Devido à limitação anatômica que a cérvice proporciona ao progresso da técnica de IA, muitos pesquisadores investigaram a associação de determinados fármacos visando à dilatação cervical ao momento da inseminação, como a ocitocina (King et al., 2004), o misoprostol (Horta et al., 2010) e o carazolol (Günduz et al., 2010), com resultados pouco expressivos.

3.1.3 Transcervical

Diante de resultados pouco expressivos de IA cervical ou vaginal como sêmen criopreservado, surgiram estudos que buscassem a deposição intrauterina do sêmen transpassando a cérvice, caracterizando a técnica de IA transcervical.

Fukui e Roberts (1978) relatam que os primeiros estudos para viabilização desta técnica ocorreram ainda na década de 1970, utilizando diversas formas de mensuração anatômica da cérvice como, por exemplo, gás carbônico e corante.

Posteriormente, uma metodologia foi proposta por Halbert et al. (1990a) visando a aplicação comercial em larga escala. Os autores identificaram eficiência na combinação de decúbito dorsal com quarto posterior elevado, uso de espéculo “bico de pato” e pinças para encontrar a cérvice e fixar seu óstio, para penetração do instrumento de IA através do canal cervical. Dessa forma, foram alcançados 82% de penetração uterina, e esta técnica passou a ser denominada “Sistema Guelph de Inseminação

Artificial Transcervical" (*Guelph System for Transcervical Artificial Insemination – GST-AI*).

Este mesmo grupo de pesquisa divulgou seus estudos em IA transcervical aplicados em campo, mensurando local de deposição do sêmen e taxa de gestação em diferentes grupos de ovelhas, demonstrando que, quanto mais profunda a penetração da pipeta, maior a possibilidade de concepção (Halbert et al., 1990b), como demonstrado na Tabela 1.

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

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

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

Alguns fatores influenciam diretamente o sucesso do *GST-AI*: estudos relatam melhor eficiência de penetração cervical a partir de maior número de repetições da técnica, bem como o período de serviço da ovelha, sendo melhores resultados ocorridos em ovelhas com último parto ocorrido em período inferior a quatro meses para ovelhas sazonais, com consequência na taxa de prenhez (Buckrell et al., 1994; Tab. 2).

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

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

a > b P=0,06; c < d P=0,01

Fatores inerentes ao sêmen (líquido ou criopreservado) e estro (natural ou sincronizado) também proporcionam variados índices reprodutivos (Windsor, 1995; McKusick et al., 1998; Donovan et al., 2004).

Adaptações à técnica *GST-AI* foram experimentadas por Naqvi et al. (1998), em que se utilizou uma agulha espinhal com uma extremidade em forma de parafuso, modificada para caber na pipeta de IA. A taxa de penetração cervical ao estro natural foi de 14,8% para não penetração (deposição do sêmen no óstio cervical), 40,4% cervical mediana e 44,7% uterina, com respectivas taxas de gestação utilizando sêmen criopreservado (500 milhões sptz/dose de 0,5mL) de 0%, 28,5% e 27,2%.

Wulster-Radcliffe e Lewis (2002) desenvolveram um instrumento para manipular a cérvice de forma atraumática e os estudos demonstraram uma taxa de concepção de 50% ao 3º dia pós IA. Entretanto, em estudo posterior com os mesmos instrumentos, foi observada taxa de gestação aos 30 dias de 5,0%, sugerindo que a transposição da cérvice pode ocasionar perdas embrionárias por alteração de imunidade no ambiente uterino (Wulster-Radcliffe et al., 2004).

No Brasil foi criado um modelo curto e de aplicador metálico, contendo um mandril de ponta romba que permite a transposição cervical (aplicador expansor ovino®, Alta Genetics, Brasil), de modo que, à retirada do mandril, realiza-se a introdução da palheta contendo a dose inseminante (Figura 1). Porém, estudos em peças anatômicas revelam que os diferentes tipos de óstio cervical e graus de interdigitação

dos anéis podem interferir na penetrabilidade deste modelo de aplicador (Moura et al., 2011).

Figura 1. Inseminação intrauterina por retração cervical com uso do aplicador expansor ovino®.

3.1.4 Laparoscopia

A proposta mais desejável de IA consiste na deposição intrauterina de sêmen criopreservado. As primeiras tentativas de IA em ovelhas com este intuito ocorreram via cirúrgica, por laparotomia, ao longo das décadas de 60 e 70, quando se observou, contudo, que tal técnica proporcionava elevada fertilização, porém baixa taxa de nascimento, principalmente por morte embrionária (Mattner et al., 1969; Killeen e Moore, 1970), além da potencial formação de adesão tecidual pós-operatória (Amiridis e Csech, 2012).

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

Em uma das primeiras pesquisas da laparoscopia comparada a inseminação cervical, McKelvey et al (1985) utilizaram ovelhas sincronizadas e sêmen fresco com 600 X 10^6 (dose única) ou 960 X 10^6 (duas doses) sptz na IA cervical e 48 X 10^6 sptz na laparoscopia, obtendo resultados semelhantes para fertilidade (67% *vs.* 75%) e prolificidade (2,21 *vs.* 1,97), respectivamente. Fair et al. (2005) demonstraram

diferenças significativas na proporção de oócitos fertilizados após IA por laparoscopia *vs.* cervical (54% *vs.* 19%). Esta superioridade nos resultados desta técnica se justifica pela possibilidade de deposição do sêmen próximo ao sítio de fecundação.

3.2 Implicações fisiopatológicas

Considerando a IA transcervical, há relatos de perfuração da cérvice e deposição de sêmen na cavidade abdominal, além de casos de abscessos peri-cervicais e piometra (Halbert et al., 1990b; McKelvey, 1994).

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

Tabela 3 – Escore de lesão tecidual na cérvice baseado na penetração da pipeta ou na secção cervical. Adaptado de Campbell et al. (1996).

Item	Quanto à penetração da pipeta			
	Cérvice	Útero	Fora do trato	Erro padrão
Lesão tecidual*	2,48 [a]	2,61 [a]	1,78 [b]	,20
(p<0,01)	Quanto à secção da cervix			
Lesão tecidual*	Vaginal	Mediana	Uterina	Erro padrão
(p<0,001)	2,73 [a]	2,42 [a]	1,72 [b]	,20

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

Na IA por laparoscopia, as implicações são relacionadas ao estresse causado pela intervenção cirúrgica, com destaque para o uso da posição céfalo-declive de Trendelemburg (Figura 2), por implicar em aspiração do conteúdo de regurgitação ruminal (Lemos et al., 2003).

.

Figura 2. Regurgitação do conteúdo ruminal de ovelha submetida à laparoscopia em posição céfalo-declive de Trendelemburg.

A IA por laparoscopia requer utilização de pneumoperitônio, através da insuflação com gás para se melhorar o campo de visão na cavidade peritoneal. No entanto, pode-se provocar aumento da pressão intra-abdominal (PIA) e hipercapnia, com consequente elevação da pressão arterial de CO2 (PaCo2) e acidose respiratória, o que significa quadro de estresse durante o procedimento (Ishizuka et al., 2000).

4 TECNOLOGIA DO SÊMEN OVINO

De acordo com Salamon e Maxwell (2000), a IA em ovinos foi iniciada nas primeiras décadas do século XX, quando estudos sobre meios de diluição e reprodução possibilitaram o desenvolvimento e aplicação prática em animais de produção. Os estudos se intensificaram após a I Guerra Mundial, liderados por Milovanov, na União Soviética da década de 1930, quando então a IA com sêmen fresco e diluído foi usada em larga escala nos programas reprodutivos de ovinos.

A necessidade de se conceber elevado número de ovelhas com sêmen de carneiros destacados demandou o transporte de sêmen dos centros de IA para diversas fazendas distantes. Aliado ao fato de se poder inseminar fora de estações reprodutivas e ter o sêmen usado por períodos mais longos, as pesquisas em estocagem de espermatozoide se ampliaram, baseando-se em métodos que reduzissem ou detivessem o metabolismo do espermatozoide e então lhe prolongasse a vida útil. Sendo assim, pesquisadores estudaram o estoque de sêmen em estado líquido, usando temperaturas reduzidas, ou em estado congelado, que envolve preservação a temperaturas abaixo de zero (Salamon e Maxwell, 2000).

4.1 Transporte, metabolismo e fertilidade da célula espermática de ovinos

O sítio de inseminação influencia na taxa de fertilização e parto, quanto mais internamente for a deposição da dose inseminante, maior a probabilidade de um melhor índice de prenhez (Killeen e Moore, 1970; Fisher Neto, 2009). Tal evidência está relacionada, entre outros aspectos, ao transporte espermático (Tabela 4) e viabilidade do espermatozoide, que pode sofrer limitações de acordo com o ambiente uterino e processo de conservação (Hawk, 1983).

Tabela 4 – Número de espermatozoides recuperados do trato reprodutivo de ovelhas em diferentes horas após acasalamento. Adaptado de Hawk (1983).

		Recuperação de espermatozoides				
Hora	N	Porção cervical			Útero	Tubas uterinas
		Posterior	Média	Anterior	(n)	(n)
		(10^6)	(10^6)	(10^6)	(10^6)	(10^6)
2	78	28	14	1,4	29 (4)	48 (19)
8	24	11	16	3,7	97	190 (9)
22 – 24	50	2	3	1,4	158	4450 (4)

Mattner et al. (1969) inseminaram ovelhas via cervical com sêmen fresco ou congelado com 100 x 10^6 sptz vivos/dose e observaram grande número de espermatozoides presentes na cérvice, útero e tubas uterinas de ovelhas após 24 horas

da IA com sêmen fresco, enquanto que esse número foi pequeno ou nulo com sêmen congelado, demonstrando a limitação do transporte espermático com a criopreservação.

Diversos estudos foram baseados no metabolismo dos espermatozoides, a exemplo de Restall (1970), que analisou parâmetros metabólicos na presença de fluidos genitais de ovelhas, demonstrando efeito da diluição do fluido da tuba uterina na respiração celular, glicólise e geração de lactato (Tabela 5).

Tabela 5 – Metabolismo (µmoles/10^8 células) dos espermatozoides ovinos incubados em fluido de tuba uterina em diferentes diluições. Adaptado de Restall (1970).

Diluição do fluido	Consumo total de oxigênio*	Carbono oxidado* (µg-átomos)	Glicose utilizada*	Lactato acumulado*
Salina controle	2,23	1,79	1,32[1]	1,49[1]
1:2	1,12	0,59	3,66	7,08
1:4	1,52	1,02	3,37	5,82
1:8	2,07	1,60	2,81	4,33
1:16	2,67	2,09	2,38	3,32

*efeito linear dentro da diluição ($p<0,01$); [1] diluições *vs.* controle ($p<0,01$).

O processo de congelação/descongelação do sêmen ovino causa danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais a um número significativo de espermatozoides, com redução da fertilidade, prejuízos no transporte e viabilidade no trato genital feminino, quando se trata de IA cervical (Salamon e Maxwell, 2000).

4.2 Limitações fisiológicas do espermatozoide com criopreservação

A evolução das técnicas de congelação de sêmen ovino se iniciou na década de 1930, com o glicerol. A partir da década de 1950, alavancou-se um vasto número de pesquisas em diversas frentes: i) diluentes (à base de citrato/açúcar, leite, lactose, sacarose, TRIS, entre outros), ii) agentes crioprotetores (glicerol, gema de ovo, lipoproteína de baixa densidade – LDL), iii) processamento, taxa de resfriamento, congelação/descongelação, iv) danos criogênicos por cristais de gelo e v) fertilidade do espermatozoide ovino (Watson, 2000).

Salamon e Maxwell (1995) destacaram alguns danos fisiológicos causados por esse processo criogênico, dentre os quais, destacam-se as perdas de proteínas por mudanças morfológicas da bainha de mitocôndrias (com consequentes reduções na síntese de ATP e ADP), distorções no axonema, liberação de TGO - transaminase glutâmico oxaloacética (produção de energia no ciclo de Krebs), perdas de lipoproteínas, fosfolipídios e aminoácidos, redução da atividade fosfatase, desequilíbrio de íons Na+ e K+, e inativação de enzimas hialuronidase e acrosina no acrossoma.

Diante das frentes de pesquisa estabelecidas em função dos danos causados à fisiologia da célula espermática, o desenvolvimento dos meios diluidores foi baseado em um conjunto complexo de funções, que envolvem i) a preservação da motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, uma vez que estabilizam o pH do meio, ii) neutralização dos produtos tóxicos gerados pelos espermatozoides, iii) proteção contra choque térmico, iv) manutenção do equilíbrio eletrolítico e pressão osmótica e v) servir como fonte de energia, estabilizar sistemas enzimáticos e inibir o crescimento bacteriano (Oliveira e Fonseca, 2013).

Por isso, diversos estudos são voltados aos métodos de conservação do sêmen, desde o processo de resfriamento e congelação (Bag et al., 2002), até a variação de componentes dos meios diluidores, como é o caso dos crioprotetores (Valente et al., 2010; Tonieto et al., 2010; Ali et al.; 2013), antioxidantes (Sicherle et al., 2011; Forouzanfar et al., 2013) e até mesmo diluentes comerciais utilizados para bovinos (Gil et al., 2003; Monreal et al., 2012).

Apesar de várias décadas de pesquisas dedicadas à tecnologia do sêmen ovino, a fisiologia das células espermáticas ainda é fortemente comprometida pela criopreservação. Os resultados práticos aplicados no campo são mundialmente incipientes e inconsistentes, agravados pela sinuosidade da cérvice em ovelhas.

5 CITOCINAS E REPRODUÇÃO EM FÊMEAS

O sistema imunológico co-atua de forma decisiva nas diversas etapas da reprodução, uma vez que exerce função de proteção contra patógenos externos e de modulação no processo de não rejeição do feto, que pode ser considerado um aloenxerto devido ao material genético paterno (Shechter et al 2013).

Neste contexto, o grupo das citocinas merece destaque por exercer um papel estratégico na modulação dos eventos reprodutivos. Citocinas são definidas como polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, heterogêneas, mediadores de origem animal, pleiotrópicas (podem agir em diversos tipos de células) e peso molecular entre 5.000 e 100.000 Da; podem ser produzidas por células do sistema imunológico através de proteinoquinases ativadas por mitógenos, exercendo efeitos específicos nas próprias células produtoras ou em células-alvo (Rice e Chard, 1998).

As citocinas são formadas em cascata, isto é, uma citocina estimula suas células-alvo a produzirem mais citocinas; liga-se a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Assim, promovem efeitos biológicos extremamente diversos, influenciando a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevida da célula imunológica, bem como regulando a produção e atividade de outras citocinas, que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória (Oliveira et al., 2011).

As citocinas T*helper*1 (Th1) são consideradas pró-inflamatórias e T*helper*2 (Th2), anti-inflamatórias; no trato reprodutivo, são utilizadas para comunicação entre as células, não somente secretadas pelo embrião, como também por linfócitos do sangue periférico, macrófagos, células endometriais e da tuba uterina (Schäfer-Somi, 2003).

A relação imunológica e endócrina proporciona no trato reprodutivo o desenvolvimento tanto de cascatas inflamatórias, que funcionam na remodelação tecidual, quanto de barreiras imunorregulatórias, que podem evitar a rejeição do concepto (Mitchell et al., 2002; Shechter et al., 2013).

Algumas interações hormonais com citocinas são evidenciadas em estágios fisiológicos distintos, dentre os quais, nos ciclos reprodutivos, no processo de reconhecimento materno e na implantação do embrião.

5.1 Ciclicidade reprodutiva

O ciclo estral de ruminantes é dependente direto do útero pelo fato do endométrio produzir prostaglandinas PGE_2 e $PGF_2\alpha$, as quais desempenham papel estratégico na ciclicidade reprodutiva. A PGE_2 tem ação luteotrópica e luteoprotetora, enquanto $PGF_2\alpha$ é luteolítica. Assim, a proporção PGE_2:$PGF_2\alpha$ é mais importante do

que seus valores isolados, sendo que esta modulação é realizada por citocinas e sistema imune (Tatcher et al., 1997; Weems et al., 2006).

Células T, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos produzem e secretam interleucinas, prostaglandinas, interferon γ (IFNγ), TNFα (Shirasuma et al., 2012) e fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e fator de crescimento de fibroblastos 2, o FGF_2 (Reynolds et al., 1994). Durante a luteólise, ocorre aumento significativo destas células no CL, com apoptose das células luteais e subsequente fagocitose destas, caracterizando a cascata luteolítica como uma resposta imune e inflamatória (Galvão et al., 2013).

Nesta ótica, Shirasuma et al. (2012) sugerem a luteólise semelhante a uma inflamação aguda, no que concerne a infiltração de células imunes, a mudança drástica no diâmetro vascular e aporte sanguíneo; a PGF2α estimula vasoconstrição e maior expressão de P-selectina, proteína que contribui para adesão de neutrófilos às células endoteliais do CL; após esta etapa, uma vasodilatação é iniciada em função da produção de óxido nítrico (NO) pelos neutrófilos e, uma vez aumentando volume e fluxo sanguíneos, um aporte maior de neutrófilos chega ao local, gerando mais adesão a este endotélio e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, TNFα, IFNγ), recrutando linfócitos e macrófagos ao local (Figura 3).

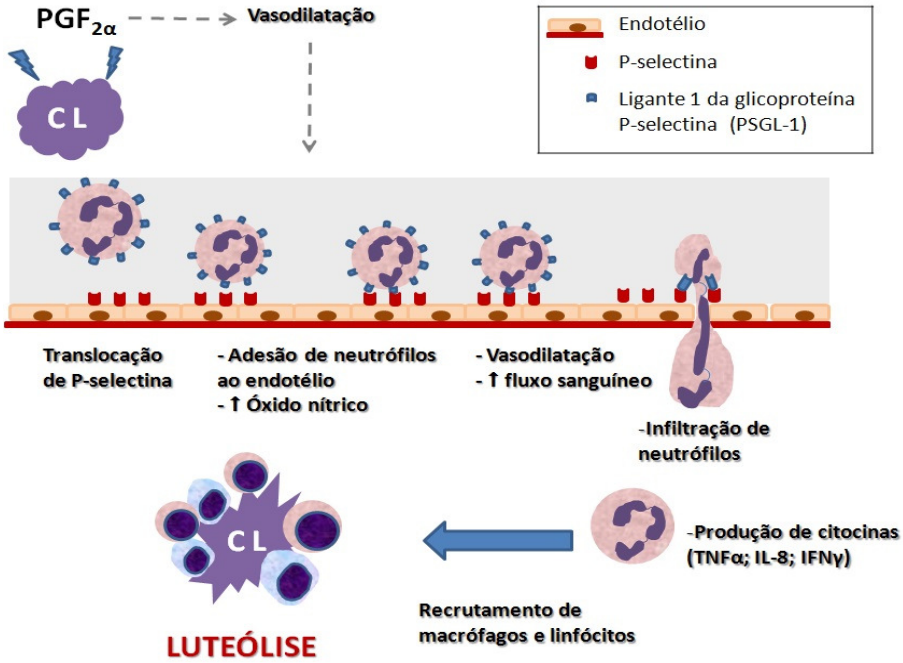

Figura 3. Ilustração da lise do corpo lúteo (CL) a partir de resposta inflamatória provocada pelo aumento da secreção de $PGF_2\alpha$

A dinâmica do crescimento folicular ovariano até a ovulação também sofre influência direta da irrigação sanguínea, através do efeito vasodilatador do NO, permitindo aporte daquelas células inflamatórias e da cascata de citocinas, além de estimular síntese de PGE e PGF2α, o que proporciona inflamação do folículo pré-ovulatório e induz sua ruptura (El Sherry et al., 2013).

5.2 Reconhecimento materno do embrião

De todas as fases reprodutivas, esta é a mais intrigante pelo fato da placenta e concepto evitarem a rejeição pelo sistema imune materno. A placenta é considerada uma fonte predominante de antígenos para células T, bem como alvo direto de qualquer resposta imune ativada. Assim, o período pré-implantação compreende interações feto-maternais que levam ao reconhecimento materno e manutenção da prenhez. O concepto sintetiza e secreta uma surpreendente quantidade de citocinas, além de enzimas, prostaglandinas e hormônios (Bazer et al., 1998).

Os sinais parácrinos e endócrinos de reconhecimento de gestação gerados pelo concepto ao sistema materno são antiluteolíticos (visando interromper a produção endometrial / intra-ovariana de PGF2α) ou luteotróficos (gerando efeito diretamente no CL) (Spencer et al., 2004).

A imunorregulação do reconhecimento materno em humanos é iniciada pelo *ovum* fertilizado, que leva a uma predominância intrauterina de células Th2. Assim, o balanço Th1/Th2 é ajustado pela progesterona, que bloqueia a imunidade Th1 ao trofoblasto, pela secreção de interleucina 10 (IL-10) dos leucócitos deciduais e pelos citotrofoblastos, que produzem interleucina 4 (IL-4), promovendo diferenciação de linfócitos Th2 (Schäfer-Somi, 2003).

Em relação aos ruminantes, ao final da década de 1980, tornou-se claro que o principal sinal para reconhecimento materno de prenhez é um interferon Tipo 1, o interferon tau (IFNτ), com estrutura homóloga aos já conhecidos IFNα e β, porém restrito ao trofectoderma embrionário (Roberts et al., 2008).

Os mecanismos de ação do IFNτ no endométrio baseiam-se na regulação e estabilização de receptores de progesterona e inibição direta de receptores para estrógeno e ocitocina, consequentemente, diminuindo a liberação de PGF2α induzida por ocitocina; da mesma forma, o IFNτ induz o endométrio a inibir produção de

enzimas necessárias à síntese de PGF2α (Spencer et al., 1995; Schäfer-Somi, 2003, Figura 4A).

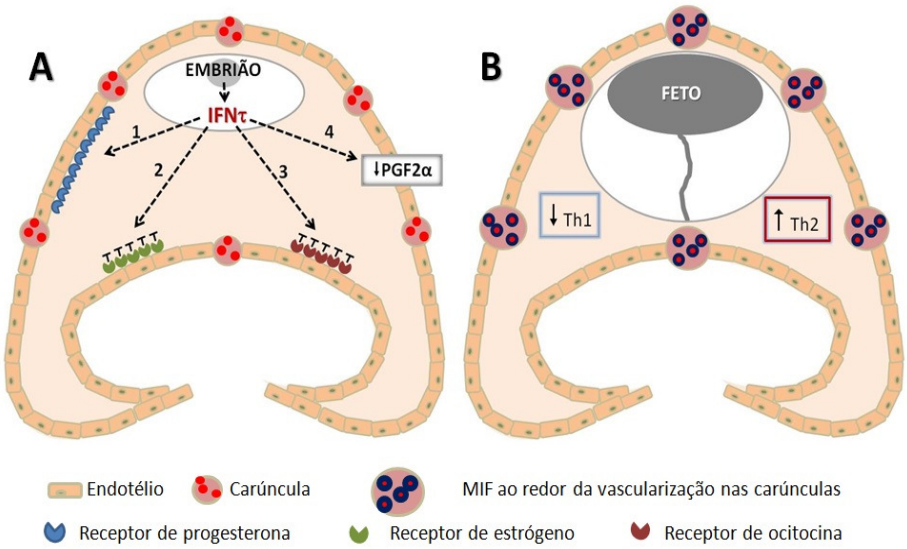

Figura 4. Envolvimento de citocinas em duas fases reprodutivas distintas em ruminantes. Durante o reconhecimento materno (A), o interferon-tau (IFNτ) produzido pelo embrião atua no endométrio promovendo a transcrição de genes para receptores de progesterona (1), inibição direta de receptores de estrógeno (2) e ocitocina (3) e produção de inibidores de enzimas necessárias à síntese de PGF2α (4). Com o avanço da gestação (B), há aumento progressivo de citocinas anti-inflamatórias Th2 em contraste com diminuição de citocinas pró-inflamatórias Th1; ao redor da vascularização das carúnculas, ocorre acúmulo do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), também como medida de imunotolerância materno-fetal.

5.3 Implantação

Este processo complexo no desenvolvimento do blastocisto envolve a aposição, adesão e invasão do trofoblasto através de ações proteolíticas ao endométrio materno. Em resposta, este apresenta reações celulares semelhantes a uma invasão por um tumor, bem como uma resposta inflamatória. Portanto, neste sítio de implantação, o papel das citocinas é fundamental para o estabelecimento bem sucedido da gestação (Rice e Chard, 1998).

Erlebacher (2013) descreve em humanos e ratos que o contato entre tecidos materno e placentário ocorre através de duas superfícies distintas, i) a superfície externa da placenta é firmada dentro da decídua materna (uma camada de tecido do estroma especializada do endométrio para desenvolvimento placentário). A justaposição da placenta e decídua cria a chamada interface materno-fetal, local onde trofoblastos placentários e leucócitos uterinos terão contato, sendo o sítio de ataque imunológico direto; ii) o sangue materno irriga os trofoblastos que residem no corpo da placenta

(vilosidades placentárias em humanos e labirintos em ratos), permitindo que antígenos placentários e outros materiais cheguem diretamente no sangue materno e com isso se module uma resposta imune.

Cross et al (1994) assertaram sobre a "janela para a implantação": enquanto que na pré-implantação o concepto pode se desenvolver sem intervenção materna, na fase de implantação se faz necessário um diálogo ativo entre células maternas e o blastocisto. O processo demanda uma sincronia no desenvolvimento do útero e blastocisto, fato que provavelmente proporciona elevada taxa de falha na transferência de embriões em humanos e animais.

Rahman et al. (2004) investigaram a expressão de citocinas no endométrio de ovelhas ao período de implantação e início de gestação, aos 17-19 dias pós coito (dpc), 26-27 dpc e 34-36 dpc, comparando com ovelhas não gestantes: as citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IFN-γ e TNF-α estiveram presentes em ovelhas não gestantes e em todas as fases de implantação, enquanto que IL-2 e IL-8 só foram fortemente detectadas a partir do 26-27 dpc; quanto as citocinas anti-inflamatórias LIF, IL-6 e IL-10, foram expressadas em menores níveis em ovelhas não gestantes, mas com visível aumento em 26-27 dpc, e IL-4 foi expressada a partir de 17-19 dpc. O que se observou foi uma mudança dinâmica e ampla envolvendo a relação Th1/Th2 na espécie ovina, favorável à prevalência de citocinas antinflamatórias.

Portanto, a relação Th1/Th2 ao longo da gestação sugere uma resposta do porquê de um feto não ser rejeitado pelo sistema imune materno, apesar da presença dos antígenos paternos em contato com as células maternas. Na interface materno-fetal as citocinas Th2 parecem ser as responsáveis pelo sucesso da manutenção da gestação (Figura 4B), sendo secretadas não somente pelas células imunocompetentes como também por células da decídua e placenta (Zenclussen et al., 2002).

Assim, o conhecimento adquirido sobre o balanço Th1/Th2 e imunotolerância são necessários para o desenvolvimento da pesquisa na Área de Reprodução Assistida, de modo que se permita o progresso na utilização de biotécnicas reprodutivas em humanos e animais.

REFERÊNCIAS

ALI, A.B.T., BOMBOI, G., FLORIS, B. Replacing chicken yolk with yolks from other sources in RAM sêmen diluents and their effects on fertility *in vitro.* **Small Ruminant Res.**, v.113, p.405-410, 2013.

AMARIDIS, G.S., CSEH, S. Assited reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Anim. Reprod. Sci**., v.130, p.152-161, 2012.

BAG, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at wich straws were punged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci**., v.72, p.175-183, 2002.

BAZER, F.W., OTT, T.L., SPENCEER, T.E. Maternal recognition of pregnancy: comparatives aspects. **Trophoblast Res**., v.12, p.375-386, 1998.

BICUDO, S.D., AZEVEDO, H.C., SILVA MAIA, M.S., SOUSA, D.B., RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta. Sci.Vet**., v.33, p.127-130, 2005.

BUCKRELL, B.C., BUSCHBECK, C., GARTLEY, C.J., KROETSCH, T., McCUTCHEON, W., MARTIN, J., PENNER, W.K., WALTON, J.S. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. **Theriogenology**, v.42, p.601-611, 1994.

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

CARDOSO, E., CRUZ, J.F., FERRAZ, R.C.N., TEIXEIRA NETO, M.R., SANTOS, R.S. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. **Rev. Bras. Cienc. Agrar. Recife**, v.4 (2), p.217-222, 2009.

CARNEIRO, P.L.S., MALHADO, C.H.M., AZEVÊDO, D.M.M.R., SOUZA, L.G.R., SILVA, D.C., ALVES, A.A., CAMPELO, J.E.G., COSTA JR., G.S. Estudo de populações de ovinos Santa Inês utilizando técnicas de análise multivariada. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, v.8-1, p.40-50, 2006.

COSTA Jr., G.S., CAMPELO, J.E.G., AZEVÊDO, D.M.M.R, MARTINS FILHO, R., CAVALCANTE, R.R., LOPES, J.B., OLIVEIRA, M.E. Caracterização morfométrica de ovinos da raça Santa Inês criados nas microrregiões de Teresina e Campo Maior, Piauí. **R. Bras. Zootec**., v.35, p.2260-2267, 2006.

CROSS, J.C., WERB, Z., FISHER, S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science,** v.266, p.1508-1518, 1994.

DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., KUMMEN, E., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Anim. Reprod. Sci**., v.84, p.359-368, 2004.

EL SHERRY, T.M., DERAR, R., BAKRY, R. Changes in blood flow in ovine follicles and serum concentration of Estradiol 17β (E2) and nitric oxide (NO) around the time of ovulation in Ossini ewes. **Anim. Reprod. Sci**., v.138, p.188-193, 2013.

ERLEBACHER, A. Mechanisms of T-cell tolerance towards the allogeneic fetus. **Nat. Rev. Immunol.**, v.13, p.23-33, 2013.

FAIR, S., HANRAHAN, J.P., O'MEARA, C.M., DUFFY, P., RIZOS, D., WADE, M., DONOVAN, A., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology,** v.63, p.1995-2005, 2005.

FERRA, J.C., SERENO, J.R.B. **Inseminação artificial em ovinos**. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 2006, 26p. Documentos / Embrapa Cerrados ISSN 1517-5111; 156.

FISCHER NETO, A. Aplicação comercial das biotécnicas reprodutivas em ovinos. **Rev. Bras. Repr. Anim**.supl., v.6, p.182-186, 2009.

FORCADA, F., SÁNCHEZ-PRIETO, L., CASAO, A., PALACIN, I., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., MUIÑO-BLANCO, T., ABECIA, J.A. Use of laparoscopic intrauterine insemination associated with a simplified superovulation treatment for *in vivo* embryo production in sheep: a preliminary report. **Anim. Prod. Sci**, v.52, 1111-1116, 2012.

FOROUZANFAR, M., ERSHAD, S.F., HOSSEINI, S.M., HAJIAN, M., OSTAD-HOSSEINI, S., ABID, A., TAVALAEE, M., SHAHVERDI, A., DIZAJI, A.V., ESFAHANI, M.H.N. Can permeable super oxide dismutase mimetic agents improve the quality of frozen-thawed ram semen? **Cryobiology,** v.66, p.126-130, 2013.

FUKUI, Y, ROBERTS, E.M. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology,** v.10 (5), p.381-393, 1978.

GALVÃO, A.M., FERREIRA-DIAS, G., SKARZYNSKI, D.J. Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum. **Mediators of Inflammation**, Volume 2013, Article ID 420186, 11 p., 2013.

GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility of ram semen frozen in a Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology,** v.59, p.1157-1170, 2003.

GÜNDÜZ, M.C., TURNA, Ö., CIRIT, Ü., UÇMAK, M., TEK, Ç., SABUNCU, A., BACINOGLU, S. Lambing rate and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. **Anim. Reprod. Sci**., v.118, p.32-36, 2010.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., BUCKRELL, B.C. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology,** v.33 (5), p.993-1010, 1990a.

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 (6), p.1231-1243, 1990b.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **J. Dairy Sci**., v.66, p.2645-2660, 1983.

HERMUCHE, P.M., SILVA, N.C., GUIMARÃES, R.F., CARVALHO JÚNIOR, O.A., GOMES, R.A.T., PAIVA, S.R., MCMANUS, C.M. Dinamics of sheep production in Brazil using principal components and auto-organization features maps. **Rev. Bras. Cart.**, v.64/6, p.821-832, 2012.

HORTA, A.E.M., BARBAS, J.P., MARQUES, C.C., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I., PEREIRA, R.M., MASCARENHAS, R.D., CAVACO-GONÇALVES, S. Improvement of fertility in artificially inseminated ewes following vaginal treatment with misoprostol plus terbutaline sulphate. **Reprod. Dom. Anim**., v.45, p. 412-416, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Prod. Pec. Mun**., v.40, p.1-71, 2012.

ISHIZUKA, B., KURIBAYASHI, Y., KOBAYASHI, Y., HAMADA, N., ABE, Y., AMEMIYA, A., AOKI, T., SATOH, T. Stress responses during laparoscopy with CO2 insufflation and with machanical elevation of the abdminal wall. **J. Am Assoc Gynecol Laparosc**, v.7(3), p.363-371, 2000.

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

KILLEEN, I.D., MOORE, N.W. Fertilization and survival of fertilized eggs in the ewe following surgical insemination at various times after the onset of oestrus. **Aust. J. biol. Sci**., v.23, p.1279-1287, 1970.

KING, M.E., McKELVEY, W.A.C., DINGWALL, W.S., MATTHEWS, K.P., GEBBIE, F.E., MYLNE, M.J.A., STEWART, E., ROBINSON, J.J. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, v.62, p.1236-1244, 2004.

LEMOS, S.L.S., VINHA, J.M., SILVA, I.S., NOVAES, P.A.C., OLIVEIRA, M.F., PAULA, G.B., REBELO, C.C., MARINHO, M.L. Efeito do pneumoperitônio com ar e CO2 na gasometria de suínos. **Acta Cir. Bras**., v.18(5), p.445-451, 2003.

MATTNER, P.E., ENTWISTLE, K.W., MARTIN, I.C.A. Passage, survival and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. **Aust. J. biol. Sci**., v.22, p.181-187, 1969.

McKELVEY, W.A.C. Recent research on AI and MOET in sheep and their commercial application in the UK. **Proc. NZ Embryo Transfer Workshop**, 1:16-17, 1994.
McKELVEY, W.A.C., ROBINSON, J.J., AITKEN, R.P. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. **Theriogenology,** v.24 (5), p.519-535, 1985.

McKUSICK BC, THOMAS DL, GOTTFREDSON RG, ZELINSKY RD, BERGER YM. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. In 'PROCEEDINGS 46TH ANNUAL SPOONER SHEEP DAY'. **Proceedings…** Madison, WI, 1998, p.32–39.

MITCHELL, S.E., ROBINSON, J.J., KING, M.E., MCKELVEY, W.A.C., WILLIAMS, L.M. Interleukin 8 in the cervix of non-pregnant ewes. **Reproduction,** v.124, p.409-416, 2002.

MONREAL, A.C.D., SCHIMID, R.F., de PAULA, J.G.S., URT, M.A.G., SOUZA, A.S. Diluentes para semen de carneiros nativos de Mato Grosso do Sul. **Rev. Agr**., v.5(17), p.281-287, 2012.

MORAIS, O.R. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil: situação atual e perspectivas para o futuro. In: III SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, BELO HORIZONTE, 2000. **Anais**...Belo Horizonte, SBMA, 2000, p.266-272, 2000.

MOURA, D.S., LOURENÇO, T.T., MOSCARDINI, M.M., SCOTT, C., FONSECA, P.O., SOUZA, F.F. Aspectos morfológicos da cérvice de ovelhas. **Pesq. Vet. Bras**., v.31, p.33-38, 2011.

NAQVI, S.M.K., JOSHI, A., BAG, S., PAREEK, S.R., MITTAL, J.P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Res**, v.29, p.329-333, 1998.

OLIVEIRA, C.M.B., SAKATA, R.K., ISSY, A.M., GEROLA, R.S. Citocinas e dor. *Rev. Bras.* **Anestesiol.**, v.61:2, p.255-265, 2011.

OLIVEIRA, M.E.F., FONSECA, J.F. Inseminação artificial. In: OLIVEIRA, M.E.F., TEIXEIRA, P.P.M., VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1ª Ed., São Paulo, Editora Med Vet, 2013. 305p.

PAIVA, S.R., PIMENTEL, C.M. Uso de marcadores moleculares como ferramenta adicional para conservação e melhoramento da raça Santa Inês.In: V CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, Aracajú, SE, 2008. **Anais...**Aracajú, SNPA, p.1-12, 2008.RAHMAN, A.N.M.A., SNIBSON, K.J., LEE, C.S., MEEUSEN, E.N.T. Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surface molecules in the sheep endometrium. **J. Reprod. Immunol**., v.64, p.45-58, 2004.

RESTALL, B.J. Effect of incubation conditions on the metabolic response of ram spermatozoa in the presence of fluids from the genital tract of the ewes. **Aust. J. biol. Sci**., v.23, p.1255-1264, 1970.

REYNOLDS, L.P., GRAZUL-BILSKA, A.T., KILLILEA, S.D., REDMER, D.A. Mitogenic factors of corpora lutea. **Prog. Growth Factor Res**, v.5, p.159-175, 1994.

RICE, A., CHARD, T. Cytokines in Implantation. **Cytokine Growth F. R.**, v.9, p.176-185, 1998.

ROBERTS, M.R., CHEN, Y., EZASHI, T., WALKER, A.M. Interferons and maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin.* **Cell Dev. Biol**., v.19, p.170-177, 2008.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Cause of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci,** v.38, p.1-36, 1995.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci**, v.62, p.77-111, 2000.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHEL, B.P., MAXWELL, W.M.C. Fertility and its relationship to motility characteristics os spermatozoa in ewes after cervical, transcervical and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **J.Androl**., v.20 (2), p.280-288, 1999.

SAÑUDO, C., MUELA, E., CAMPO, M.M. Key factors involved in lamb quality from farm to fork in Europe. **J. Integr. Agr**., v.12, p.1919-1930, 2013.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Anim. Reprod.** *Sci.*, v.75, p.73-94, 2003.

SHECHTER, R., LONDON, A., SCHWARTZ, M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educacional gates. **Nat. Rev. Immunol.**, v.13, p.206-218, 2013.

SHIRASUMA, K., NITTA, A., SINEENARD, J., SHIMIZU, T., BOLLWEIN, H., MIYAMOTO, A. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance and regression in the cow. **Dom. Anim. Endocrinol**., v.43, p.198-211, 2012.

SICHERLE, C.C., MAIA, M.S., BICUDO, S.D., RODELLO, L., AZEVEDO, H.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Res**., 2011, v.95, p.144-149, 2011.

SIMPLÍCIO, A.A., SANTOS, D.O. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais. In: 42º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Goiânia, GO, 2005. **Anais**... Goiânia, SBZ, p.136-148, 2005.

SOUZA, W.H., LOBO, R.N.B., MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: estado da arte e perspectivas. In: 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE O AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA, 2003, João Pessoa, PB. **Anais**... João Pessoa, EMEPA, 2003.

SPENCER, T.E., BECKER, W.C., GEORGE, P., MIRANDO, M.A., OGLE, T.F., BAZER, F.W. Ovine interferon-τ regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. **Biol. Reprod**., v.53, p.732-745, 1995.

SPENCER, T.E., BURGHARDT, R.C., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.,** v.82-83, p.537-550, 2004.

TATCHER, W.W., BINELI, M., BURKE, J., C.R. STAPLES, AMBROSE, J.D., COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology,** v.47, p.131-140, 1997.

TONIETO, R.A., GOULARTE, K.L., GASTAL, G.D.A., SCHIAVON, R.S., DESCHAMPS, J.C., LUCIA Jr., T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Res**., v.93, p.206-209, 2010.

VALENTE, S.S., PEREIRA, R.M., BAPTISTA, M.C., MARQUES, C.C., VASQUES, M.I., SILVA PEREIRA, M.V.C. In vitro and in vivo fertility of RAM semen cryopreserved in different extenders. **Anim.Reprod. Sci**., v.117, p.74-77, 2010.
VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v.12, p.1-9, 2008.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci**., v.6-61, p.481-492, 2000.

WEEMS, C.W., WEEMS, Y.S., RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Vet. J.,** v.171, p.206-228, 2006.

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

WULSTER-RADCLIFFE, M.C., LEWIS, G.S. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and transversing the cervix on semen quality and fertility. **Theriogenology,** v.58, p.1361-1371, 2002.

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

ZENCLUSSEN, A.C., FEST, S., BUSSE, P., JOACHIM, R., KLAPP, B.F., ARCK, P.C. Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. **Am. J. Reprod. Immunol**., v.48, p.245-251, 2002.

.

II OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se avaliar a viabilidade da técnica de inseminação artificial transcervical com retração da cérvice em ovelhas da raça Santa Inês, por meio de parâmetros comportamentais, endócrinos, histológicos e imunológicos.

III CAPÍTULO I

Comportamento, parâmetros endócrinos e histológicos de ovelhas Santa Inês sincronizadas e submetidas à técnica de inseminação artificial por retração cervical (*)

RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência da técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC) no comportamento e parâmetros endócrinos e histológicos de ovelhas Santa Inês com estro sincronizado. Oitenta e três ovelhas foram submetidas a dois tratamentos hormonais e outras 10 ovelhas foram manejadas sob condições naturais. Em um grupo de tratamento hormonal, foram aplicadas duas injeções IM de 125µg de cloprostenol com sete dias de intervalo (Synchrovine®); no outro grupo foram utilizadas esponjas intravaginais impregnadas com MAP + 125µg de cloprostenol + 200 UI de eCG. Mimetizando a IRC, realizou-se a retração cervical até a abertura vulvar e utilização de um aplicador metálico contendo mandril para transpassar os anéis cervicais, o quanto fosse possível, depositando uma dose de sêmen descongelado com baixa viabilidade. A profundidade de penetração foi classificada como cervical superficial, média, profunda ou intrauterina. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de estradiol, dias -1 e 0, e progesterona, dias 0, 3, 5, 12, 17 (dia 0 = IRC/estro natural). Para a histologia, foram coletadas cérvices sem IRC, 24h e 72h pós-IRC. O protocolo MAP proporcionou maior ocorrência de estro nas primeiras 24h e maior nível de estradiol no intervalo 25-48h pós-tratamento ($P<0,05$). As taxas de retorno ao estro até 20 dias após IRC foram similares nos dois protocolos. A deposição intrauterina do sêmen foi alcançada em 83,5% das ovelhas, demandando um tempo médio de 32 segundos, sendo que 9,3% das ovelhas apresentaram reação forte à manipulação cervical. Os níveis de progesterona foram semelhantes em todas as ovelhas sincronizadas ou com estro natural. Histologicamente, foi evidenciada reação inflamatória intensa 24h após IRC, com presença de hemorragia, edema e degeneração celular. No entanto, após 72h horas, o quadro inflamatório se mostrou atenuado, com reorganização tecidual. A inseminação artificial por retração cervical permitiu deposição intrauterina de sêmen sem provocar mudanças histológicas permanentes ou comprometer o ciclo estral subsequente.

Palavras-chave: aplicador expansor, cérvice, fisiologia reprodutiva, histologia, Synchrovine®.

(*) Submetido ao periódico *Small Ruminant Research* (protocolo Rumin-D-15-6634)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the artificial insemination by cervical retraction technique (RCI) on behavior and endocrine and histological parameters of Santa Ines ewes with synchronized estrus. Ewes (n = 83) were submitted to two hormonal treatments and one group (n = 10) was managed under natural condition. In a group, ewes were treated with two doses IM of cloprostenol (125 µg) seven day apart (Synchrovine®); in another group, intravaginal sponge impregnated with MAP associated with IM doses of cloprostenol (125 µg) and eCG (200 IU) were used. Mimicking the RCI, the cervix was tractioned up to the vulvar opening and, by means of metallic catheter equipped with mandrill, the cervical rings were overpass, as much as possible, where frozen low viability semen was deposited. The penetration depth was classifies as cervical superficial, medium, deep or intrauterine. Blood samples were collected from both synchronized and natural ewes for estradiol dosage, days -1 and 0, and progesterone, days 0, 3,5,12,17 (day 0 = RCI/natural estrus). For histology, cervices were collected without RCI, 24 and 72h post RCI. The MAP protocol provide high estrus rate at 24 h and higher level of estradiol between 25-48h post treatment ($P<0.05$). The estrus response rate up to 20 days after RCi were similar in both protocols. The intrauterine deposition of semen occurred in 83.5% of the ewes, requiring on average 32 seconds; only 9.3% of the ewes showed strong reaction to cervix handling. The progesterone levels were similar in all ewes with synchronized or natural estrus. Histologically, intense inflammatory reaction was observed at 24h post-RCI, with hemorrhage, edema and cellular degeneration, but this inflammation was attenuated at 72h post-RCI, with tissue reorganization. In conclusion, insemination by cervical retraction allows intrauterine deposition of semen without provoking permanent histological changes or compromise the subsequent estrus cycle.

Keywords: Expanding catheter; cervix; histology, reproductive physiology, Synchrovine®

INTRODUÇÃO

O avanço genético de um rebanho pode ser alcançado utilizando-se biotécnicas de reprodução animal, como a inseminação artificial (IA). Esta técnica permite que reprodutores de elevado padrão genético possam servir a um número superior de fêmeas por estação reprodutiva, quando comparada com a monta natural, otimizando o uso desse animal (Simplício et al., 2007). Adicionalmente, o uso da IA permite que os reprodutores possam ser comparados em diferentes rebanhos, contribuindo para melhoria da base de dados dos programas de avaliação genética (Pedrosa et al., 2010)

Na espécie ovina, contudo, a IA com uso de sêmen congelado-descongelado ainda apresenta entraves, as taxas de prenhez são geralmente inferiores àquelas obtidas com sêmen fresco. Esses baixos índices são atribuídos a possíveis danos causados aos espermatozoides durante o processo de congelação-descongelação, comprometendo deslocamento espermático, viabilidade e capacidade de fertilização (Salamon e Maxwell, 1995). Na tentativa de contornar a redução da capacidade de deslocamento dos espermatozoides, a técnica da IA por laparoscopia, com deposição intrauterina, tem possibilitado a obtenção de taxa de prenhez satisfatória com uso do sêmen congelado-descongelado, no entanto, está atrelada a procedimentos invasivos e onerosos (Cardoso et al., 2009).

No que se refere à fêmea, a anatomia cervical das ovelhas também consiste em um entrave para alcance do sucesso da inseminação artificial por via cervical, uma vez que a disposição irregular dos anéis cervicais dificulta a passagem dos aplicadores convencionais até o corpo do útero (Kershaw et al, 2005). Com isso, Halbert et al. (1990a) idealizaram o sistema *Guelph,* que consiste na tração e fixação da cérvice para possibilitar a transposição dos anéis cervicais. No entanto, os resultados de fertilidade alcançados com o uso dessa técnica variam de acordo com alguns fatores, como protocolos hormonais, número de partos, estacionalidade e raça (Windsor, 1995; McKusick et al., 1998). A despeito da potencialidade dessa técnica de IA, alguns estudos demonstraram que a transfixação cervical pode influenciar negativamente a endocrinologia reprodutiva da ovelha no momento da fertilização ou do reconhecimento do embrião (Flint et al., 1975; Barnes, 2000; Wulster-Radcliffe et al., 2004).

A influência da raça nos resultados de IA cervical já foi reportada (Donovan et al., 2004; Fair et al., 2005), sinalizando a importância de estudos em raças específicas, a

exemplo da raça Santa Inês, considerada uma raça de rusticidade e baixa estacionalidade reprodutiva na ovinocultura brasileira, progressivamente estudada e presente na formação de rebanhos multiplicadores (Sousa et al., 2003). Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da técnica de inseminação artificial por retração cervical nos parâmetros comportamentais, endócrinos e histológicos de ovelhas da raça Santa Inês.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamentos

Todos os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (protocolo nº 68/2014).

O estudo foi realizado na Estação Experimental Fazenda Almada, setor de ovinocultura, município de Ilhéus, BA (14º48'S, 39º03'O), com médias anuais de precipitação pluviométrica de 1988 mm, temperatura 23,4 ± 1,5ºC e umidade relativa 85,4 ± 4,0% (Almeida, 2001). Foram utilizadas 93 ovelhas da raça Santa Inês, pluríparas, com idade entre três e quatro anos, peso vivo médio de 52,20 ± 4,60 kg e escore de condição corporal médio de 3,4 ± 0,4 (escala 1-5), além de quatro rufiões vasectomizados para identificação do estro. Os animais foram manejados diariamente em piquetes de *Brachiaria humidicola* das 8:00h às 16:00h e suplementados com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e concentrado à base de milho e soja (15% PB) na quantidade média de 400g/cab/dia; sal mineral (Guabiphos ovinos AE®, Guabi, Brasil) e água foram *ad libitum*.

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, no qual 83 ovelhas foram distribuídas em dois grupos e submetidas a dois protocolos de sincronização do estro; no grupo 1 (Synchrovine®) foram aplicadas IM duas vezes 125µg de cloprostenol (Ciosin®, MSD Saúde Animal, Brasil) com intervalo de sete dias (Menchaca e Rubianes, 2004); no grupo 2 (MAP) foram inseridas esponjas intravaginais contendo 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Brasil), mantidas por nove dias, no sétimo dia foram aplicados IM 125µg de cloprostenol e 200 UI de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil). Um grupo controle (GC) foi composto por 10 ovelhas ao estro natural e sem procedimento de IA. A observação do estro ocorreu a

partir do fim de cada protocolo por um período de 72 horas, duas vezes ao dia, às 7:00h e 19:00h, com auxílio de carneiros vasectomizados, na proporção de 1:10 fêmeas. Também foram monitorados o intervalo entre o final do protocolo e o início do estro, distribuição do início do estro e retorno ao estro até 20 dias pós IA.

Técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC)

Após observação do comportamento de estro, 23 ovelhas do grupo Synchrovine® e 20 do grupo MAP foram inseminadas artificialmente pela técnica transcervical (IRC), 54-56 horas após o final de cada protocolo. Para manutenção das ovelhas em estação foi utilizado um brete com uma tábua de apoio ventral e os membros posteriores imobilizados com uso de cordas. Para realização da IRC (Fig. 1), após higienização da região vulvar, utilizou-se um espéculo vaginal de 15 cm e fonte de luz para visualização do óstio cervical. Realizou-se a retração da cérvice até a abertura vulvar e fixação por meio de duas pinças *Allis* de 25 cm de comprimento; posteriormente foi utilizado um aplicador metálico de 12 cm contendo um mandril (Aplicador expansor ovino®, Alta Genetics, Brasil) para transpor os anéis cervicais, tanto quanto possível (Fig.2). Em seguida foi introduzida uma palheta de 0,25 mL contendo sêmen descongelado de baixa viabilidade espermática (motilidade progressiva inferior a 30%, vigor inferior a 3,0 e/ou dose inseminante com menos de 40.10^6 de espermatozoides com movimento progressivo após descongelação a 35-37ºC por 30 segundos). Esta medida foi realizada para se permitir a observação dos parâmetros comportamentais e endócrinos do ciclo estral, sem a possível influência de conceptos no ambiente uterino.

Figura 1. Procedimentos da técnica de inseminação artificial por retração cervical em ovelhas. A) Contenção em estação e higienização da região vulvar; B) Localização do óstio cervical com auxílio de espéculo vaginal; C) Retração da cérvice até a abertura vulvar com auxílio de pinças Allis; D) Transposição dos anéis cervicais com uso do aplicador expansor ovino®; E) Local de deposição do sêmen tão profundo quanto possível; F) Deposição de sêmen descongelado de baixa viabilidade espermática.

Dependendo da profundidade alcançada pelo aplicador, a deposição do sêmen foi realizada pela cervical superficial, cervical média, cervical profunda ou intrauterina. O tempo gasto para penetração da cérvice até o local de deposição do sêmen foi cronometrado; a intensidade de reação da ovelha à execução da técnica foi classificada como: fraca (pouco ou nenhum movimento, pouco ou nenhum balido, mínima reação à introdução do espéculo ou aplicador), moderada (tentativas esparsas de se soltar da contenção, balidos isolados e reações esporádicas à introdução do espéculo ou aplicador) e forte (tentativas constantes de se soltar da contenção, balidos frequentes e reação imediata à introdução do espéculo ou aplicador).

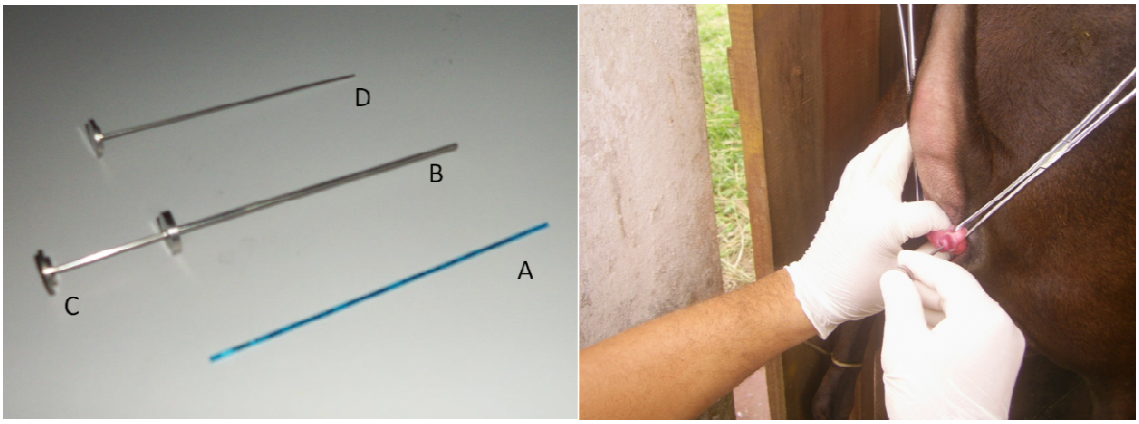

Figura 2. À esquerda: palheta 0,25mL (A), aplicador de sêmen (B), mandril para transposição cervical (C) e êmbolo para deposição da dose inseminante (D); à direita, realização da inseminação artificial transcervical com retração da cérvice em ovelhas em estação.

Dosagem hormonal

Para determinação do perfil endócrino foram coletadas amostras de sangue de 10 ovelhas de cada grupo através de venopunção pela veia jugular com auxílio de agulhas e tubos coletores a vácuo sem anticoagulante (BD Vacutainer®, Inglaterra) nos dias -1 e 0 (estradiol) e nos dias 0, 3, 5, 12 e 17 (progesterona), sendo o "dia 0" referente à realização da IRC. Também foram coletadas amostras de sangue de 10 ovelhas não tratadas, isto é, com estro natural e não submetidas à IRC, sendo o "dia 0", neste caso, o dia da ocorrência do estro. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos e o soro obtido foi armazenado em freezer a – 20ºC. A dosagem hormonal foi realizada com as amostras em duplicata por Radioimunoensaio no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense, RJ. Para quantificar o 17β estradiol foi utilizado kit RIA DSL4800 (Beckman Coulter®, Immunotech, República Tcheca), com sensibilidade de 2,2 pg/mL e coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio de 8,9% e 12,2%, respectivamente. Para dosagem da progesterona, o kit RIA IM1188 (Beckman Coulter®, Immunotech, República Tcheca), com sensibilidade de 0,05 ng/mL e coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio de 6,5% e 7,2%, respectivamente.

Histologia cervical

Para avaliação histológica foram utilizadas cérvices oriundas de seis ovelhas abatidas em três momentos distintos em relação ao dia da IRC: a) sem IRC; b) 24 horas e c) 72 horas após IRC. A cérvice foi seccionada transversalmente em três porções

(superficial, média e profunda) e cada uma delas foi subseccionada em outras três porções. Os cortes foram incluídos em formaldeído a 10% por 36 horas e levados ao Laboratório de Histopatologia Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, onde foram processados em banhos com alcoóis e xilol e embebidos em parafina líquida. Os blocos moldados foram seccionados em micrótomo para confecção de lâminas, que foram desparafinadas, banhadas sequencialmente por xilol, alcoóis e água destilada, e posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (HE). A avaliação das lâminas, com auxílio de um microscópio óptico em aumentos de 100x e 400x, foi realizada por três observadores distintos.

Análise estatística

Os dados referentes ao estro (ocorrência, distribuição e retorno), local de deposição do sêmen e intensidade de reação da ovelha à IRC foram comparados pelo teste Qui-quadrado (EXCEL, 2007). As médias (± dp) do intervalo protocolo-estro e tempo de penetração cervical foram comparadas pelo teste F, enquanto que, para a comparação das dosagens hormonais foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls (PROC GLM, SAS versão 9.1). As diferenças foram consideradas significativas com $P<0,05$.

RESULTADOS

Comportamento estral e estradiol

O protocolo MAP (cloprostenol + progesterona + eCG) proporcionou maior ocorrência de estro (20,7%) que o Synchrovine® (duas doses de cloprostenol). A maioria das ovelhas manifestou estro no intervalo entre 25 e 48 horas após o final do tratamento, independente do protocolo hormonal, sendo 94,0% no grupo Synchrovine® e 79,6% no MAP, o que se refletiu na semelhança dos intervalos entre protocolo e início de estro. No entanto, o número de ovelhas em estro nas primeiras 24 horas foi maior no protocolo MAP, 15,4%, enquanto que com o protocolo Synchrovine® não ocorreu estro neste período ($P < 0,05$). O número de ovelhas que apresentaram estro tardiamente (após 48 h do tratamento) foi similar, 6,0% e 5,0% nos protocolos Synchrovine® e MAP, respectivamente (Tab. 1).

Não houve diferença significativa entre os protocolos nas taxas de retorno ao estro no período de 20 dias após IRC (P>0,05), sendo que 77,0% das ovelhas tratadas retornaram ao estro neste período (Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros comportamentais de ovelhas Santa Inês sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP) e submetidas à técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC)

Grupo	Synchrovine®	MAP
N	43	40
Ocorrência de estro (%)	76,8[a]	97,5[b]
Intervalo protocolo – estro (h)	40,9 ± 9,6[a]	39,4 ± 11,2[a]
Distribuição do início do estro (%)		
até 24 horas	0,00[a]	15,4[b]
25 a 36 horas	42,5[a]	36,0[a]
37 a 48 horas	51,5[a]	43,6[a]
49 a 60 horas	3,0[a]	2,5[a]
61 a 72 horas	3,0[a]	2,5[a]
N	23	20
Retorno ao estro até 20 dias após técnica IRC (%)	74,0[a]	80,0[a]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (P < 0,05) pelo Teste Qui-quadrado.

Os níveis séricos de 17β estradiol nos dias -1 e 0 foram significativamente superiores em ovelhas submetidas ao protocolo MAP, comparando-se com o Synchrovine® (20,1 *vs* 9,1 pg/mL e 7,1 *vs* 2,9 pg/mL, respectivamente, P < 0,05). Em ambos os protocolos foi observado um declínio acentuado do estrógeno entre os dias avaliados, o que não ocorreu com ovelhas ao estro natural, cujos níveis séricos foram similares (11,3 e 9,7 pg/mL) (Fig. 3).

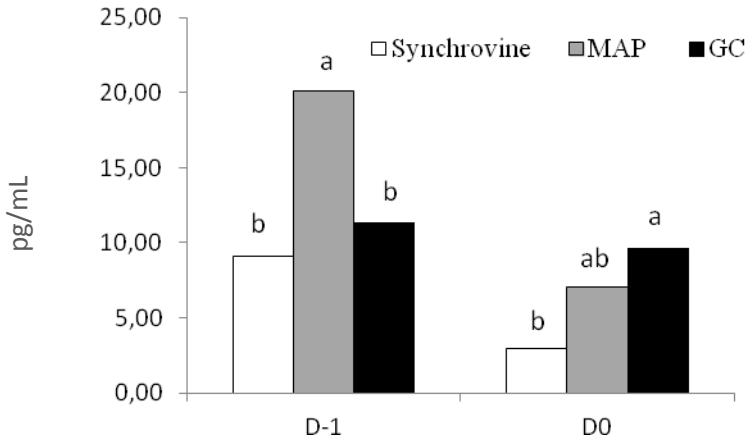

Figura 3. Níveis séricos de 17β estradiol (pg/mL) em ovelhas sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP) e submetidas à técnica de IA por retração cervical no dia zero (D0). Grupo controle (GC) composto por ovelhas ao estro natural e sem IA. $P < 0,05$ pelo teste SNK.

IATC e progesterona

Em relação à técnica IRC, não houve influência dos protocolos de sincronização do estro em nenhum dos parâmetros avaliados (Tab. 2). Do total de ovelhas inseminadas, em apenas 16,5% ocorreu deposição cervical média, não sendo possível ultrapassar o segundo anel, contudo, uma vez superada esta barreira, a deposição intrauterina do sêmen foi viabilizada em 83,5% das ovelhas; o tempo médio de manipulação da cérvice foi de 32 segundos, com variação de oito a 90 segundos (tempos mínimo e máximo, respectivamente).

Considerando todas as ovelhas inseminadas, a ocorrência de reações pequenas e médias à manipulação cervical foi de 41,9% e 48,8%, respectivamente, com apenas 9,3% das fêmeas apresentando reações fortes (Tab. 2).

Tabela 2. Desempenho da técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC) em ovelhas Santa Inês sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP)

Grupo	Synchrovine®	MAP
N	23	20
Local de deposição do sêmen (%)*		
cervical superficial	0,0[a]	0,0[a]
cervical médio	13,0[a]	20,0[a]
cervical profundo	0,0[a]	0,0[a]
Intrauterino	87,0[a]	80,0[a]
Tempo de penetração cervical (s)**	32,68 ± 25,28[a]	30,94 ± 14,68[a]
Intensidade da reação da ovelha à IRC (%)*		
Fraca	39,1[a]	45,0[a]
Moderada	52,2[a]	45,0[a]
Forte	8,7[a]	10,0[a]

* P > 0,05 pelo Teste Qui-Quadrado; ** P > 0,05 pelo Teste F.

Os níveis séricos de progesterona das ovelhas sincronizadas e submetidas à IRC (Synchrovine® ou MAP) foram equivalentes às condições fisiológicas observadas em ovelhas com estro natural e sem manipulação cervical (GC), não divergindo entre si ao longo do ciclo estral subsequente (P>0,05, Fig. 4).

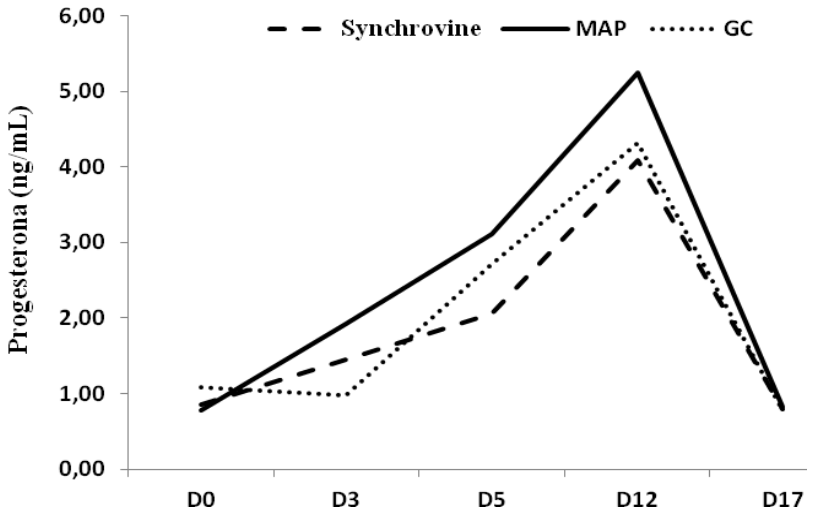

Figura 4. Níveis séricos de progesterona em ovelhas sincronizadas com prostaglandina (Synchrovine®) ou progestágeno (MAP) e submetidas à técnica de IA por retração cervical no dia zero (D0). Grupo controle (GC) composto por ovelhas ao estro natural e sem IA. (P>0,05 pelo teste SNK).

Histologia

Os cortes histológicos demonstraram integridade tecidual ao momento do estro (sem IRC) e reação inflamatória mais intensa 24 horas após IATC, com presença de hemorragia, edema e degeneração celular. Após 72 horas, foi observado que este quadro inflamatório se atenuou, com reorganização tecidual (Fig. 5).

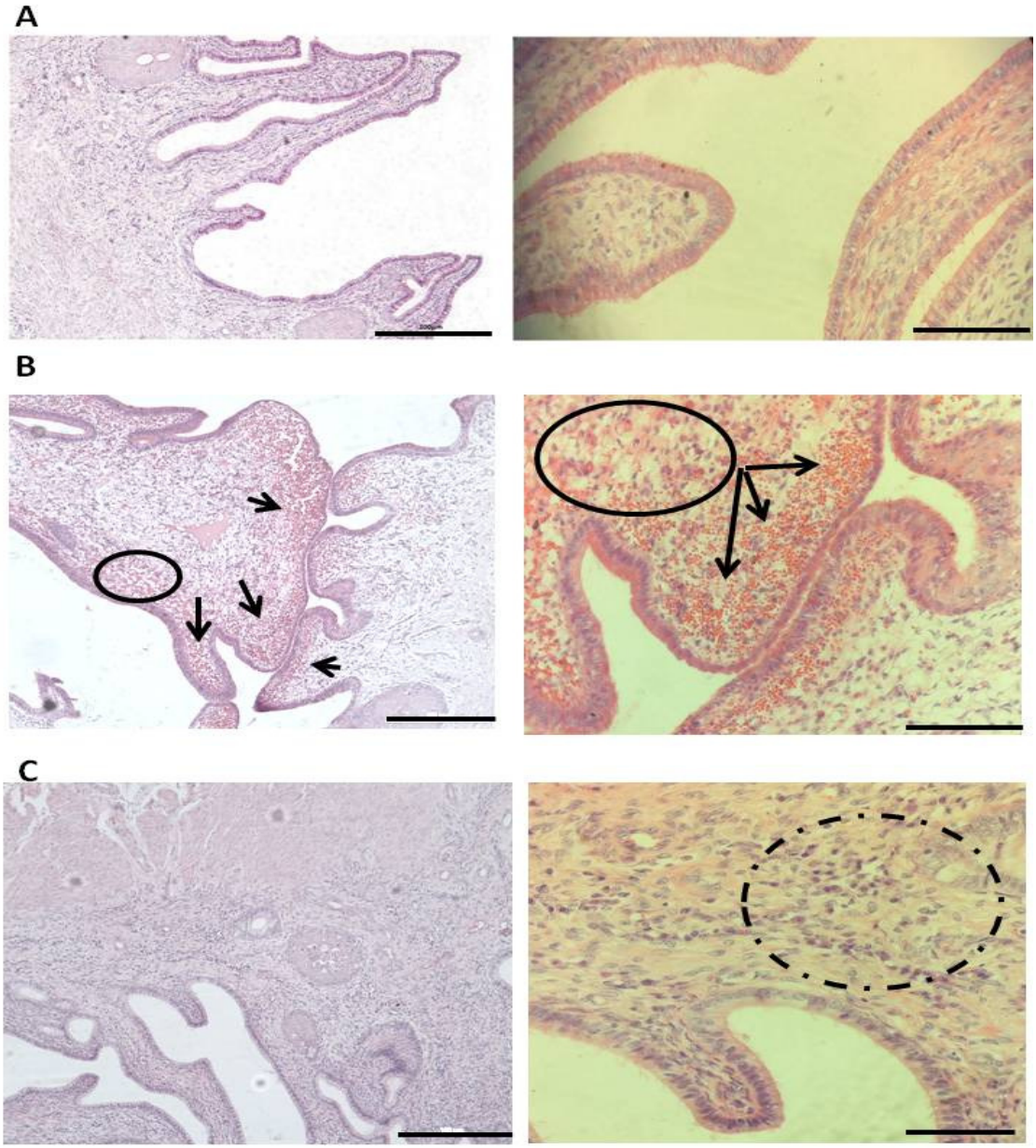

Figura 5: Histologia de cérvices de ovelhas submetidas à técnica de inseminação artificial por retração cervical (IRC) em diferentes momentos (HE, microscopia óptica, à esquerda: aumento de 100x, barra 100µm; à direita: 400x, 50µm). A) sem IRC: ausência de alterações teciduais; B) 24h pós-IRC: focos de hemorragia intensa (setas); presença de células inflamatórias (neutrófilos) e edema/degeneração celular (área circundada); C) 72h pós-IRC: poucas áreas com presença de linfócitos (plasmócitos, área pontilhada) e reorganização tecidual.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os protocolos hormonais foram semelhantes aos encontrados na literatura, com ocorrência de estro 25-48h pós-tratamento variando de 80% a 87% no Synchrovine® (Menchaca et al., 2004; Fierro et al., 2011) e 85% a 88% com MAP por nove dias (Santos et al., 2011; Gottardi et al., 2014). Portanto, o protocolo Synchrovine® pode ser recomendado para sincronização do estro em ovelhas da raça Santa Inês, uma vez que o tratamento hormonal com prostaglandina apresenta facilidade de aplicação, menor custo, além de ser considerado um método com caráter ético, por sua rápida metabolização e por não apresentar riscos de resposta humoral, como ocorre com o uso sucessivo do eCG (Olivera-Muzante et al., 2011a).

As elevadas e similares taxas de retorno ao estro no período de 20 dias após IRC, nos dois protocolos hormonais, corroboraram resultados de outros estudos, cujas taxas de retorno ao estro foram 75% com o protocolo Synchrovine® (Olivera-Muzante et al., 2011b) e 78-90% com o protocolo MAP (Olivera-Muzante et al., 2011b; Gottardi et al., 2014) após IA cervical. Com isso, é possível sugerir que a manipulação e retração da cérvice realizada durante a IRC não interferem no comportamento estral do ciclo subsequente.

O maior número de ovelhas manifestando estro nas primeiras 24h pós-tratamento com MAP pode ser justificado pela utilização do eCG que, por sua ação estimulante sobre crescimento folicular, contribui para elevação dos níveis séricos de estrógeno (Dias et al., 2001). A maior concentração sérica de 17β estradiol observada nos dias -1 e 0 nas ovelhas submetidas ao protocolo MAP em relação ao Synchrovine® corrobora essa hipótese.

Quanto aos parâmetros avaliados da técnica de IRC (local de deposição do sêmen, tempo de penetração cervical e intensidade de reação da ovelha), não se observou diferenças entre os protocolos hormonais estudados. O maior nível sérico de estradiol observado em MAP parece não ter aumentado a penetrabilidade do aplicador. Embora o grau de relaxamento da cérvice durante o estro esteja associado ao aumento do estradiol, também se faz necessária a participação dos hormônios gonadotróficos (FSH e LH) e oxitocina na geração de uma cascata bioquímica que resulta na produção de fatores parácrinos, como a prostaglandina E2 (PGE2), atuante no rearranjo das fibras celulares da musculatura lisa cervical (Falchi e Scaramuzzi, 2013). Da mesma forma,

considerando que a dilatação cervical ao estro também esteja relacionada à degradação do colágeno na matriz extracelular, que envolve sinalização da interleucina 8 (IL-8) para infiltração de neutrófilos (Croy et al., 1999), o desempenho apresentado neste estudo está de acordo com relato de Mitchel et al. (2002), que revelou níveis de IL-8 semelhantes no tecido cervical de ovelhas sincronizadas com prostaglandina ou progestágeno.

A irregularidade cervical em ovelhas é maior no segundo e terceiro anéis, o que compromete a profundidade de penetração de alguns modelos de aplicadores (Halbert et al., 1990b). O uso de um modelo convencional de aplicador proporcionou a penetração intrauterina em menos de 7% das cérvices, determinando a profundidade média de penetração em torno de 36,0 mm, o que é condizente com a distância entre o segundo anel e o óstio cervical (Kershaw et al.,2005). Em ovelhas da raça Corriedale, a utilização de aplicador convencional possibilitou penetrabilidade de 20%, 40%, 30% e 10% para região cervical superficial, média, profunda e intrauterina, respectivamente (Rabassa et al., 2007). O uso do sistema *Guelph* de IRC possibilitou maior penetrabilidade em comparação aos aplicadores convencionais, alcançando 40,4% e 44,7% de deposição cervical média e intrauterina, respectivamente (Naqvi et al., 1998). Apesar do relato da dificuldade de penetração do aplicador expansor em peças anatômicas oriundas de abatedouros (Moura et al., 2011), neste estudo, o fato de se realizar a transfixação da cérvice em momento de estro possivelmente proporcionou diminuição do desalinhamento dos anéis cervicais, traduzido em menor tempo para realização da IRC.

A forma de contenção do animal também é um fator que pode interferir nos resultados da IRC. Embora a contenção da ovelha em decúbito dorsal facilite a penetração do cateter através do canal cervical (Halbert et al., 1990a), a contenção da ovelha em estação realizada permitiu elevada penetrabilidade da cérvice. A baixa ocorrência de reações fortes à manipulação cervical, independente do protocolo hormonal, sugere que a forma de contenção foi adequada. A minimização do estresse que a IRC pode proporcionar é um aspecto fundamental, visto que a produção elevada de cortisol no momento da IA pode comprometer a taxa de prenhez (Hill et al., 1998; Emsen et al., 2011).

Ovelhas que apresentam possíveis anormalidades no padrão secretório de progesterona podem ter a fertilidade comprometida (Barnes et al., 2000). Assim, embora exista relato de que o protocolo a base de prostaglandina possa interferir no ciclo estral por comprometer a formação do corpo lúteo (CL) e, consequentemente, a produção de progesterona (Wiley et al., 1997), este fato não foi verificado com esse estudo, uma vez que os níveis de progesterona ficaram dentro da normalidade, corroborando com estudo prévio realizados com o mesmo protocolo (Fierro et al., 2013). Não foi observada influência da retração e manipulação cervical durante a IA nos subsequentes níveis séricos de progesterona, apesar da afirmativa que a manipulação da cérvice de ovelhas gestantes proporciona elevação de $PGF_{2\alpha,}$ podendo ocasionar luteólise (Flint et al., 1975).

O uso de sêmen de viabilidade espermática comprovadamente baixa permitiu a avaliação da influência da técnica IRC nos parâmetros hormonais do ciclo estral subsequente, sem a interferência de possíveis conceptos. Os embriões, por secretarem quantidades expressivas de citocinas, enzimas, prostaglandinas e hormônios para reconhecimento materno (Shäfer-Somi, 2003), certamente proporcionariam alterações no ambiente uterino, descaracterizando, portanto, um ciclo estral. Com isso, foi possível observar que, independente do protocolo hormonal, a técnica IRC utilizada neste estudo, por si, não alterou a fisiologia do ciclo estral subsequente quanto aos aspectos comportamentais e luteotróficos.

A reação inflamatória local 24 horas após a manipulação da cérvice era previsível. Campbell et al. (1996), Sayre e Lewis (1997) citam que lesões ao epitélio cervical podem ser provocadas por aplicadores. O maior aporte de células inflamatórias pode ocasionar maior secreção de PGF_{α} e provocar luteólise (Weems et al., 2006). Entretanto, esta manipulação parece não ter comprometido a formação do CL, uma vez que a secreção de progesterona ao longo do ciclo estral foi mantida dentro dos parâmetros fisiológicos. Esta situação é reforçada pela redução do processo inflamatório e reorganização tecidual na cérvice dentro de 72 horas pós-IRC, período em que o CL é altamente responsivo à ação luteolítica da $PGF2_{\alpha}$ (Rubianes et al., 2003).

CONCLUSÕES

A inseminação artificial transcervical, com tração de cérvice, permite deposição do sêmen intrauterino sem provocar alterações histológicas permanentes ou comprometer o ciclo estral subsequente.

CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum declarado.

AGRADECIMENTOS

À FAPESB (APP 0069/2011), pelo apoio financeiro, ao Laboratório de Patologia Animal da UESC, pela viabilização da análise histológica, à Alta Genetics, pelo fornecimento dos aplicadores expansores.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, H.A. **Probabilidade de ocorrência de chuva no sudeste da Bahia**. Ilhéus/BA: Ed. Ceplac, n.182, 27p., 2001.

BARNES, F.L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v.53, p.649-658, 2000.

CAMPBELL, J.W., HARVEY, T.G., MCDONALD, M.F., SPARKSMAN, R.I. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, v.45, p.1535-1544, 1996.

CARDOSO, E., CRUZ, J.F., FERRAZ, R.C.N., TEIXEIRA NETO, M.R., SANTOS, R.S. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár**., v.4, n.2, p.217-222, 2009.

CROY, B.A., PRUDENCIO, J., MINHAS, K., ASHKAR, A.A., GALLIGAN, C., FOSTER, R.A., BUCKRELL, B., COOBER, B.L. A preliminary study on the usefulness of HUIL-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. **Theriogenology**, v.52, p.271-287, 1999.

DIAS, F.E.F., LOPES JÚNIOR, E.S., VILLAROEL, A.B.S., RONDINA, D., LIMA-VERDE, J.B., PAULA, N.R.O., FREITAS, V.J.F. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.53, p.618-623, 2001.

DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., KUMMEN, E., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Anim. Reprod. Sci**., v. 84, p.359-368, 2004.

EMSEN, E., GIMENEZ-DIAS, C., KUTLUCA, M. KOYCEGIZ, F. Reproductive response of ewes synchronized with different legths of MGA treatments in intrauterine insemination program. **Anim. Repr. Sci**., v.126, p.57-60, 2011.

FALCHI, L., SCARAMUZZI, R.J. The expression of Erα, OTR, $cPLA_2$, COX-2 and PPARγ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. **Theriogenology**, v.79, p.40-47, 2013.

FAIR, S., HANRAHAN, J.P., O'MEARA, C.M. DUFFY, P., RIZOS, D., WADE, M., DONOVAN, A., BOLAND, M.P., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, v.63, p.1995-2005, 2005.

FIERRO, S., OLIVERA-MUZANTE, J., GIL, J. VIÑOLES, C. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy and fecundity in sheep. **Theriogenology**, v.76, p.630-639, 2011.

FIERRO, S., GIL, J., VIÑOLES, C. OLIVERA-MUZANTE, J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology**, v.79, p.399-408, 2013.

FLINT A.P.F., FORSLING, M.L., MITCHELL, M.D. TURNBULL, A.C. Temporal relationship between changes in oxytocin and prostaglandin F levels in response to vaginal distension in the pregnant and nonpregnant ewe. **J. Reprod. Fertil.**, v.43, p.551–554, 1975.

GOTTARDI, F.P., SOUZA JÚNIOR, A., BARBOSA, Y.G.S. MARQUES, C.A.T., BEZERRA, L.R., ARAÚJO, M.J., MINGOTI, G.Z., TORREÃO, J.N.C. Efeito do flushing sobre o desempenho reprodutivo de ovelhas Morada Nova e Santa Inês submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.66, p.329-338, 2014.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., BUCKRELL, B.C. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v.33, p.993-1010, 1990a.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., BUCKRELL, B.C. The structure of the cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v.33, p.977-992, 1990b

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **J. Dairy Sci.**, v.66, p.2645-2660, 1983.

HILL, J.R., Thompson, J.A., Perkins, N.R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28.447 ewes under commercial conditions. **Theriogenology**, v.46, p.697-709, 1998.

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

MCKUSICK, B.C., THOMAS, D.L., GOTTFREDSON, R.G., ZELINSKY, R.D., BERGER, Y.M. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. In: **Proceedings** 46th annual spooner sheep day. Madison, WI, p.32–39, 1998.

MENCHACA, A., RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reprod. Fertil. Develop**., v.16, p.403-413, 2004.

MENCHACA, A., MILLER, V., GIL, J., PINCZAK, A., LACA, M., RUBIANES, E. Prostaglandin F2α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. **Reprod. Dom. Anim**., v.39, p.352-355, 2004.

MITCHELL, S.E., ROBINSON, J.J., KING, M.E., MCKELVEY, W.A.C., WILLIAMS, L.M. Interleukin 8 in the cervix of non-pregnant ewes. **Reproduction**, v.124, p.409-416, 2002.

MOURA, D.S., LOURENÇO, T.T., MOSCARDINI, M.M., SCOTT, C., FONSECA, P.O., SOUZA, F.F. Aspectos morfológicos da cérvice de ovelhas. **Pesq. Vet. Bras**., v.31, p.33-38, 2011.

NAQVI, S.M.K., JOSHI, A., BAG, S., PAREEK, S.R., MITTAL, J.P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Res**, v.29, p.329-333, 1998.

OLIVERA-MUZANTE, J., FIERRO, S., LÓPEZ, V., GIL, J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology,** v.75, p.1232-1238, 2011a.

OLIVERA-MUZANTE, J., GIL, J., FIERRO, S., MENCHACA, A., RUBIANES, E. Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v.76, p.1501-1507, 2011b.

PEDROSA, V.B., SANTANA Jr., M.L., OLIVEIRA, P.S., ELER, J.P., FERRAZ, J.B.S. Population structure and inbreeding effects on growth traits of Santa Inês sheep in Brazil. **Small Rumin Res.**, v.93, p.135-139, 2010.

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

RUBIANES, E., MENCHACA, A., CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2α. **Anim. Reprod. Sci**., v.78, p.47-55, 2003.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci**., v.38, p.1–36, 1995.

SANTOS, G.M.G., SILVA-SANTOS, K.C., MELO-STERZA, F.A., MIZUBUTI, I.Y., MOREIRA, F.B., SENEDA, M.M. Desempenho reprodutivo de ovelhas mestiças lanadas e deslanadas submetidas a protocolo hormonal a base de progestágeno e eCG durante a contraestação reprodutiva. **Semin. Cienc. Agrar**., v.32, p.723-732, 2011.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide.** Version 9.1 ed: Cary. SAS Institute, USA, 2003.

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

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Anim. Reprod. Sci**., v.75, p.73-94, 2003.

SIMPLÍCIO, A.A., FREITAS, V.J.F., FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Rev.Bras. Reprod. Anim**., v.31, p.234-246, 2007.

SOUSA, W.H., LOBO, R.N.B., MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: estado da arte e perspectivas. In: II Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos de corte, João Pessoa, EMEPA. **Anais**... João Pessoa, PB, p.501-522, 2003.

WEEMS, C.W., WEEMS, Y.S., RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Vet. J**., v.171, p.206-228, 2006.

WILEY, T.M., CÁRDENAS, H., POPE, W.F. Effect of the rate of progesterone decline at luteolysis on the ovulatory follicles and subsequent estrous cycle length in ewes. **Anim. Reprod. Sci**., v.46, p.78-87, 1997.

WINDSOR, D.P. Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. **Theriogenology**. v43, p.1009-1018, 1995.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; WANG, S.; LEWIS, G.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.

IV CAPÍTULO II

Viabilidade técnica da inseminação artificial por retração cervical com sêmen congelado comercial em ovelhas Santa Inês

RESUMO

Objetivou-se avaliar tecnicamente a inseminação artificial transcervical com retração de cérvice (IRC) com o uso de sêmen congelado comercial. Foram utilizadas 148 ovelhas da raça Santa Inês divididas em sete grupos. Um grupo controle foi composto por ovelhas com estro natural e cobertas por monta natural (MN), e seis grupos com estro sincronizado (MAP por 12 dias + 200 UI de eCG) e inseminadas em horário fixo (55±1h). A inseminação artificial foi transcervical por retração da cérvice (IRC) ou laparoscopia (ILA), utilizando sêmen fresco (F) ou congelado de origem comercial "1" ou "2" (C_1 e C_2). Com isso, proporcionaram-se os grupos: IRCF, $IRCC_1$, $IRCC_2$, ILAF, $ILAC_1$ e $ILAC_2$. Para realização da IRC as ovelhas foram contidas adequadamente em brete e mantidas em estação. Foram mensurados os tempos de penetração e execução da IA, o local de deposição do sêmen e a reação da ovelha à técnica. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de progesterona (D_0, D_3, D_5, D_{12} e D_{17}, sendo D_0 o dia da IA ou MN). Posteriormente foram computadas as taxas de não-retorno ao estro (NRE), perda embrionária (PE), gestação (D_{35}) e fertilidade ao parto. Os tempos médios de penetração cervical e IA foram 55,4 ± 21,2 s e 3,5 ± 0,8 min, respectivamente. A intensidade da reação à IRC foi fraca ou moderada em 91,2% das ovelhas. Os níveis séricos de progesterona após IA (IRC ou ILA) ou MN foram similares. As taxas de não-retorno ao estro dos grupos inseminados foram similares, exceto o grupo ILAF que foi superior ($P<0,05$). As perdas embrionárias foram baixas e similares nos grupos inseminados com sêmen fresco (0,0% para IRCF e 7,0% para ILAF); com sêmen congelado, as taxas de perda embrionária foram 25,0%, 43,0%, 0,0% e 20,0% para $IRCC_1$, $IRCC_2$, $ILAC_1$ e $ILAC_2$, respectivamente. Os grupos IRC e ILA apresentaram taxas de fertilidade similares com sêmen fresco (50,0 e 50%) ou congelado (17,5% e 20,4%). A técnica de inseminação artificial com retração da cérvice, estando a ovelha contida em estação, apresenta praticidade, não interfere no subsequente perfil endócrino e possibilita índices reprodutivos similares à inseminação por laparoscopia.

Palavras-chave: inseminação transcervical, laparoscopia, ovinos, perfil endócrino.

ABSTRACT

The aim of this study was to technical evaluate the transcervical artificial insemination by cervical retraction (RCI) using commercial frozen-thawed semen. Santa Inês ewes (n=148) were assigned in seven groups. The control group was composed by ewes with natural estrus and natural mating (NM). Six groups were submited to hormonal treatment (MAP for 12 days + eCG 200 IU) and timed insemination (55 ± 1h) by RCI or laparoscopy (LAI), using fresh semen (F) or two kinds of commercial frozen semen (C1 and C2). These groups were named as RCIF, RCIC1, RCIC2, LAIF, LAIC1 e LAIC2. To perform RCI, the ewes were kept in station on an inseminating stand. The time required for penetrate into the cervical canal, as well as time required to perform RCI were recorded; local deposition of semen and the reaction of the ewe to the technique were measured. Blood samples were collected to perform the progesterone dosage at D0, D3, D5, D12 and D17 (D0 = AI/NM). The non-return to estrus rate (NRE), embryo loss (EL), pregnancy (at D35) and fertility were evaluated. The mean time for cervical penetration and AI were 55.4 ± 21.2 s and 3.5 ± 0.8 min, respectively. The reaction intensity to RCI was weak or moderate in 91.2% of the ewes. The serum levels of progesterone after AI (RCI or LAI) or NM were similar. The non-return to estrus of the inseminated ewes were similar, except for the ILAF group, which was higher ($P<0.05$). The embryo losses were low and similar in ewes inseminated with fresh semen (0.0% for RCI and 7.0% for LAIF); in frozen semen group, the embryo losses were 25.0%, 43.0%, 0.0% e 20.0% for IRCC1, IRCC2, ILAC1 e ILAC2, respectively. The RCI and LAI showed similar fertility rates with fresh (50.0% and 50.0%) or frozen (17.5% and 20.4%) semen. In conclusion, artificial insemination by cervical retraction, with restraining in station, show practicability, and does not change the subsequent endocrine profile, providing reproductive rates similar to laparoscopy insemination. On the other hand, the use of this technique along with commercial frozen semen presents low fertility rate.

Keywords: endocrine profile, ewes, laparoscopy, transcervical insemination

INTRODUÇÃO

A criação de ovinos apresenta características produtivas e sociais condizentes com a crescente demanda por alimentos, como ciclo curto de produção, prolificidade e potencial exploração em áreas pequenas. Contudo, para acelerar resultados produtivos em rebanhos comerciais faz-se necessário intensificar o progresso genético utilizando animais que apresentem características produtivas e reprodutivas adequadas ao ambiente onde serão utilizadas. Nesta ótica, a raça Santa Inês merece destaque pelo seu valor adaptativo e reprodutivo em diferentes regiões (Sousa et al., 2003).

A biotécnica de inseminação artificial (IA) possibilita a disseminação de material genético melhorado em nível de campo. Em ovinos, porém, existem entraves que limitam sua utilização em larga escala, pela disposição irregular dos anéis cervicais da ovelha, que dificultam a passagem dos aplicadores convencionais, constituindo-se no principal entrave para realização da IA nesta espécie (Sánchez-Partida et al., 1999; Kershaw-Young et al., 2010).

A utilização de IA vaginal e cervical com sêmen fresco produz taxas de fertilização aceitáveis, mas a curta vida útil dos reprodutores ovinos aliada a quantidade limitada de doses por ejaculado restringem o uso dos animais superiores (Donovan et al., 2004). Por outro lado, a utilização do sêmen ovino sob a forma congelada tem proporcionado baixos índices reprodutivos, visto que o processo de congelação/descongelação compromete a motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Salamon e Maxwell, 2000).

A IA por laparoscopia possibilita incremento nas taxas de fertilidade uma vez que viabiliza a deposição intrauterina do sêmen. No entanto, é uma técnica de difícil aplicabilidade comercial, devido ao custo elevado dos equipamentos, necessidade de profissional especializado e preocupação com bem-estar animal (Anel et al., 2005).

Halbert et al. (1990a) desenvolveram um método de IA por retração cervical utilizando uma sonda com ponta curva e contenção da ovelha em decúbito dorsal, que ficou conhecido como “Sistema Guelph de IA Transcervical” (*Guelph System of Transcervical AI – GST*). No entanto, devido a possibilidade desta técnica ocasionar lesões na cérvice (Campbell et al., 1996), diversas adequações ao método transcervical foram investigadas, desde adaptações dos aplicadores convencionais até o uso de

fármacos dilatadores cervicais (Leethongdee et al., 2010; Álvarez et al., 2012). Adicionalmente, os índices reprodutivos alcançados com a IA transcervical associada ao sêmen congelado são bastante variáveis, entre 10% e 55% (Sanchez-Partida et al., 1999; Halbert et al., 1990b). Assim, objetivou-se avaliar tecnicamente a viabilidade da inseminação artificial por retração cervical em ovelhas Santa Inês, utilizando sêmen congelado disponível comercialmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamentos

Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob o protocolo nº 68/2014.

O estudo foi realizado na Estação Experimental Fazenda Almada, setor de ovinocultura, município de Ilhéus-BA (14º47'20"S, 39º02'56"O), com precipitação pluviométrica anual média de 1.988 mm, temperatura 23,4 ± 1,5ºC e umidade relativa 85,4 ± 4,0% (Almeida, 2001) Foram utilizadas 148 ovelhas da raça Santa Inês, pluríparas, com idade entre quatro e oito anos, peso vivo médio de 52,2 ± 4,6 kg e escore de condição corporal médio de 3,4 ± 0,4 (escala 1-5), dois carneiros Santa Inês e quatro machos rufiões. As três categorias foram manejadas separadamente em piquetes de *Brachiaria humidicola* das 8:00h às 16:00h e suplementadas com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e concentrado à base de milho e soja (15% PB) na quantidade média de 400g/cab/dia; sal mineral (Guabiphos ovinos AE®, Guabi, Brasil) e água *ad libitum*.

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado. As ovelhas foram distribuídas em sete grupos, sendo que em seis grupos foram submetidas à sincronização de estro por meio de esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Brasil), mantidas por 12 dias; no momento da retirada das esponjas foram aplicados IM 200 UI de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil). A inseminação artificial (IA) foi realizada 55±1 h após a aplicação do eCG. Seis grupos foram formados com a combinação de duas técnicas de IA, transcervical com retração da cérvice (IRC) ou laparoscopia (ILA), e três tipos de sêmen, fresco (F), congelado de origem comercial "1" (C_1) e "2" (C_2), O sétimo grupo

consistiu em ovelhas pré-sincronizadas com o mesmo protocolo hormonal e submetidas à monta natural (MN) no ciclo estral subsequente, funcionando como grupo controle.

Monta natural e Inseminação artificial

A identificação do estro foi realizada com auxílio de rufiões, na proporção de 1:10 fêmeas e a subsequente monta natural foi realizada por reprodutores previamente avaliados e aprovados por meio exame andrológico.

Para a execução da IA por retração cervical (IRC), as ovelhas foram mantidas em estação em um brete com tábua de apoio ventral e membros posteriores imobilizados com uso de cordas. Após higienização da região vulvar, utilizou-se um espéculo vaginal de 15 cm e fonte de luz para visualização do óstio cervical; realizou-se a retração da cérvice até a abertura vulvar e fixação por meio de duas pinças Allis de 25 cm de comprimento; posteriormente foi utilizado um aplicador metálico de 12 cm contendo um mandril (Aplicador expansor ovino®, Alta Genetics, Brasil) para transpor os anéis cervicais, tanto quanto possível; em seguida foi introduzida uma palheta de 0,25 mL contendo o sêmen da cada grupo específico. Como parâmetros de desempenho desta técnica, foi cronometrado o tempo de penetração da cérvice até o local de deposição do sêmen, bem como o tempo da IRC, isto é, desde a ovelha contida até a sua liberação. Dependendo da profundidade alcançada pelo aplicador, a deposição do sêmen foi realizada cervical ou intrauterina. Foi avaliada a intensidade de reação de cada ovelha, seguindo a classificação “fraca” (pouco ou nenhum movimento, pouco ou nenhum balido, mínima reação à introdução do espéculo ou aplicador), “moderada” (tentativas esparsas de se soltar da contenção, balidos isolados e reações esporádicas à introdução do espéculo ou aplicador) e “forte” (tentativas constantes de se soltar da contenção, balidos frequentes e reação imediata à introdução do espéculo ou aplicador).

Para a execução da IA laparoscópica (ILA), as ovelhas foram submetidas a um jejum prévio de 24h; após antissepsia e tricotomia da região abdominal, as ovelhas foram contidas em maca especial, em decúbito dorso-oblíquo a 60º com porção caudal suspensa, procedendo-se a anestesia local com lidocaína 2% (Anestésico L®, Pearson, Brasil) em dois pontos abdominais próximos à localização dos cornos uterinos; após duas pequenas incisões, realizou-se a punção com trocáteres, uma cânula para acesso do laparoscópio (Karl Storz®, Germany), e outra para acesso do manipulador para localização do útero e, posteriormente, do aplicador de sêmen com bainha agulhada;

uma vez localizados os cornos uterinos, procedeu-se a inseminação, depositando metade da dose (0,25mL) em cada corno uterino.

Ambas as técnicas de IA foram realizadas pelo mesmo inseminador e equipe de apoio.

Tipos de sêmen

O sêmen fresco utilizado foi obtido dos mesmos reprodutores da monta natural; a coleta foi realizada por meio de vagina artificial e o sêmen foi imediatamente avaliado após a coleta. Os ejaculados, que apresentaram no mínimo 70% de espermatozoides com motilidade progressiva e vigor 5 (1-5) foi diluído com solução de água de coco (50%), água destilada (25%) e citrato de sódio a 5% (25%), para proporcionar 200.10^6 espermatozoides/dose (palhetas de 0,25mL).

O sêmen congelado, oriundo de dois diferentes reprodutores nacionais, foi adquirido de duas centrais idôneas de IA ("C_1" e "C_2"), com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As avaliações dos dois lotes de sêmen (seis partidas) foram disponibilizadas pelas respectivas empresas (Tab. 1). Ao momento da IA, o sêmen foi descongelado por imersão em água aquecida a 37ºC por 30 segundos.

Tabela 1. Valores de motilidade progressiva (MP), vigor e concentração espermática ao descongelamento e após teste de termorresistência (TTR) de partidas do sêmen de origem comercial*

Central de IA	Raça	Partida	Ao descongelamento			TTR 35º / 3h		0.25mL (sptz . 10^6)
			Ano	MP (%)	Vigor (0-5)	MP (%)	Vigor (0-5)	
"C_1"	Dorper	1	2011	55	3	30	3	80
		2		45	5	25	3	80
		3		40	4	20	3	80
		média		46,7	4,0	25,0	3,0	80,0
"C_2"	Santa Inês	1	2007	40	4	20	4	100
		2		50	4	20	3	105
		3		50	4	30	4	98
		média		46,7	4,0	23,3	3,7	101,0

*Informações transcritas dos laudos emitidos pelos respectivos fornecedores das doses de sêmen.

Índices reprodutivos

A taxa de não-retorno ao estro foi determinada com auxílio de rufiões por um período de 21 dias pós IA ou MN (NRE); o diagnóstico de gestação ou visualização de vesícula embrionária sem embrião foi realizado por ultrassonografia com transdutor retal de 8 MHz (Falco Vet 100, Pie Medical) aos 35 dias pós IA ou MN; A taxa de perda embrionária foi estimada pela diferença entre as taxas de NRE e de gestação. A taxa de fertilidade foi determinada ao parto (n. partos/ n. matrizes).

Dosagem hormonal

Para determinação do perfil endócrino foram coletadas amostras de sangue de 10 ovelhas em cada técnica (IRC, ILA e MN) através de venopunção pela veia jugular com auxílio de agulhas e tubos coletores a vácuo sem anticoagulante (BD Vacutainer®, Inglaterra), nos dias 0, 3, 5, 12 e 17 para dosagem de progesterona (P_4), sendo o "dia 0" referente à realização da IA ou ocorrência do estro na MN. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos e o soro obtido foi armazenado em freezer a –20ºC. A dosagem hormonal foi realizada com as amostras em duplicata por Radioimunoensaio no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense, RJ; para dosagem de P_4, foi utilizado o kit RIA IM1188 (Beckman Coulter®, Immunotech, República Tcheca), com sensibilidade de 0,05 ng/mL e coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio de 6,5% e 7,2%, respectivamente.

Análise estatística

Os dados referentes ao local de deposição do sêmen, intensidade de reação da ovelha, taxas de não-retorno ao estro, perda embrionária, gestação e fertilidade foram comparados pelo teste Qui-quadrado (GraphPad Prism versão 6). Para a comparação das médias (±DP) do tempo de inseminação, tempo de penetração da cérvice, níveis séricos de progesterona foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls (PROC GLM, SAS versão 9.1); as diferenças foram consideradas significativas com $P<0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho da técnica IRC

O tempo necessário para penetração da cérvice com definição do local para deposição do sêmen foi em torno de 60s (Tab. 2), contudo houve expressiva variação individual, sendo o menor e o maior tempo de 13 e 97 segundos, respectivamente. O tempo total para realização da inseminação e liberação da ovelha foi em torno de 3:00 min. para os dois grupos. O tempo demandado para descongelação da palheta não influenciou no tempo total para IA com o uso do sêmen fresco ou congelado.

Tabela 2. Tempo para penetração da cérvice (TPC), tempo para inseminação artificial por retração cervical (TIRC), taxa de deposição do sêmen e intensidade de reação em ovelhas Santa Inês

Tipos de sêmen	TPC (s)*	TIRC (min ± s)*	Taxa de deposição do sêmen (%)**		Intensidade de reação (%)**		
			Cerv	IU	Fra	Mod	For
Fresco	45,1 ± 17,5	3:07 ± 57	80,0[a]	20,0[b]	70,0[a]	20,0[b]	10,0[b]
Congelado ($C_1 + C_2$)	60,4 ± 19,9	3:45 ± 35	47,5[a]	52,5[a]	75,0[a]	17,5[b]	7,5[b]
Média	52,8 ± 21,2	3:26 ± 47	63,8[a]	36,2[a]	72,5[a]	18,7[b]	8,8[b]

Cerv.: cervical; IU: intrauterina; Fra: fraca, Mod.: moderada, For: forte.
* Valores não diferiram entre si pelo teste SNK (P>0,05).
** Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha, no mesmo parâmetro, diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

Alguns relatos com a técnica de IA por retração cervical mostram tempos de IA/ovelha entre 3:00 e 8:00 min (Buckrell et al., 1994; Windsor et al., 1994), variação esta atribuída a fatores como raça, idade e período de serviço, além da habilidade do inseminador (Naqvi et al., 1998; Kaabi et al., 2006). Neste estudo, o menor tempo gasto para realização da IA pode ser atribuído à contenção em estação ser mais prática em relação ao decúbito dorsal. A não diferença de tempo entre a IA com sêmen fresco ou congelado foi devido ao fato do descongelamento ter sido realizado simultaneamente aos procedimentos de penetração da cérvice.

A taxa de deposição de sêmen intrauterina foi similar à cervical nas ovelhas inseminadas com sêmen congelado (P > 0,05), no entanto, utilizando sêmen fresco, observou-se taxa de deposição intrauterina inferior à cervical (P < 0,05). Relatos com inseminação intrauterina por retração cervical variam entre 45% e 90%, sob influência direta da anatomia da cérvice, isto é, tipo de óstio, comprimento, quantidade e disposição dos anéis (Windsor et al., 1994; Naqvi et al., 1998; Kershaw et al., 2005; Moura et al., 2011). O sêmen fresco apresenta viabilidade e capacidade de transporte comprovadamente superiores comparadas ao sêmen congelado (Mattner et al., 1969). Dessa forma, é possível que o uso de sêmen fresco neste estudo tenha influenciado o inseminador a não insistir em se alcançar a deposição intrauterina, resultando, portanto, em maior deposição cervical. Esta cautela, contudo, se faz necessária devido aos riscos de lesões ao tecido epitelial ou mesmo situações mais graves, como perfuração da cérvice e deposição do sêmen fora do trato reprodutivo (Campbell et al., 1996).

A intensidade da reação à IRC foi fraca ou moderada em 91,2% das ovelhas (Tab. 2). Diversos autores relatam a execução da IA transcervical utilizando a contenção em decúbito dorsal (Halbert et al, 1990a, Buckrell et al., 1994; Wulster-Radcliffe et al., 2004). Entretanto, a baixa intensidade de reações fortes apresentada neste estudo (8,8%) sugere que a forma de contenção em estação tenha sido eficaz em seu intuito de não comprometer o bem-estar da ovelha durante a manipulação, visto que o decúbito dorsal em ângulos de 60º a 80º constitui-se em um método anti-anatômico para a ovelha, exige maior período de jejum prévio (24h), sob o risco de ocorrência de aspiração de conteúdo de regurgitação ruminal (Ferranti et al., 2013). Além disso, pode ocasionar um quadro de estresse, o que, consequentemente, interfere na concepção (Pierce et al., 2009).

Índices reprodutivos

As ovelhas naturalmente cobertas apresentaram os melhores resultados reprodutivos comparados às ovelhas inseminadas (P < 0,05, Tab. 3), reforçando que boas condições fisiológicas de ovelhas e andrológicas de carneiros, bem como o manejo de criação, favorecem o desempenho reprodutivo (Simplício et al., 2007). Estes resultados, utilizados como referência, proporcionaram maior acuidade na avaliação das técnicas de IA e na influência do tipo de sêmen.

Tabela 3. Taxas de não retorno ao estro (NRE), gestação, perda embrionária (PE) e de fertilidade em ovelhas Santa Inês submetidas a diferentes técnicas de inseminação artificial ou monta natural

Grupo	n	NRE (%)	Gestação (%)	PE (%)	Fertilidade (%)
IRCF	20	50,0[bc]	50,0[b]	0,0[b]	50,0[b]
$IRCC_1$	20	20,0[c]	15,0[c]	25,0[b]	15,0[c]
$IRCC_2$	20	35,0[bc]	20,0[c]	43,0[a]	20,0[c]
ILAF	24	58,3[b]	54,2[b]	7,0[b]	50,0[b]
$ILAC_1$	24	20,8[c]	20,8[c]	0,0[b]	20,8[c]
$ILAC_2$	20	25,0[c]	20,0[c]	20,0[b]	20,0[c]
MN	20	90,0[a]	85,0[a]	5,6[b]	85,0[a]
IRC média	60	35,0[a]	28,3[a]	19,0[a]	28,3[a]
ILA média	68	35,3[a]	32,3[a]	8,5[a]	30,8[a]

IRCF: Inseminação artificial com retração da cérvice (IRC) com sêmen fresco; $IRCC_1$ e $IRCC_2$: IRC com sêmen congelado comercial 1 e 2; ILAF: IA por laparoscopia (IAL) com sêmen fresco; $ILAC_1$ e $ILAC_2$: IAL com sêmen congelado comercial 1 e 2; MN: monta natural.
Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste qui-quadrado (P<00,5).

Em relação às ovelhas inseminadas, a taxa de não retorno ao estro foi mais alta com o uso combinado da laparoscopia com sêmen fresco e mais baixa com uso do sêmen congelado comercial (P<0,05), no entanto, não houve diferença entre as técnicas (IRC *vs* ILA). O processo de congelação/descongelação do sêmen ovino causa danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais em elevada proporção de espermatozoides, reduzindo a capacidade de transporte e de fertilização (Salamon e Maxwell, 2000). Este fato foi evidenciado quando as taxas de não retorno ao estro foram comparadas em função do tipo de sêmen (congelado *vs* fresco), sendo o dobro no sêmen fresco (54,2% *vs.* 25,2%).

As perdas embrionárias foram baixas e similares entre os tipos de sêmen (P > 0,05, Tab. 3). Com sêmen congelado foi observada maior variação entre os grupos, entretanto, não houve diferença quando comparadas as técnicas IRC e ILA (P > 0,05), corroborando os resultados encontrados em outros estudos, cujos valores variam de 5% a 30% (Fair et al., 2005; Olivera-Muzante et al., 2011). Observa-se assim que a perda

embrionária ocorre independentemente do local de deposição do sêmen (cervical ou intrauterina), podendo ser justificada tanto pelos danos funcionais provocados pela criopreservação como pela idade inadequada do espermatozoide ou oócito à fecundação (Watson, 2000).

A utilização do sêmen fresco proporcionou melhores taxas de gestação e fertilidade do que com sêmen congelado ($P<0,05$, Tab. 3). Não houve diferença quanto à origem comercial do sêmen congelado nem quanto à técnica de IA (IRC ou ILA). Uma ovelha submetida à laparoscopia com sêmen fresco apresentou aborto, o que reduziu a taxa de fertilidade.

Diversos autores relatam ampla variação quanto às taxas de gestação obtidas por meio da IA com retração cervical e sêmen congelado, cujos valores variaram de 19% a 55%, o que se atribui à influência de diversos fatores, tais como raça (Halbert et al., 1990b; Kaabi et al, 2006), idade, período de serviço (Buckrell et al., 1994), protocolo hormonal, repetibilidade da técnica (Windsor, 1995), dose inseminante e meio diluidor (Salamon e Maxwell, 1995).

Os resultados de fertilidade com IA utilizando sêmen congelado por laparoscopia foram inferiores aos encontrados em outros estudos, os quais obtiveram valores entre 40% e 77% (McKusick et al., 1998; Rabassa et al., 2007; Cardoso et al., 2009; Olivera-Muzante et al., 2011). Contudo, não se observou influência da raça do carneiro nos índices reprodutivos (C_1 Dorper *vs.* C_2 Santa Inês), embora exista relato sobre a superioridade espermática de carneiros Santa Inês em relação ao Dorper, em nível de campo (Frazão Sobrinho et al., 2014).

Considerando que as ovelhas inseminadas com sêmen fresco apresentaram desempenhos superiores àquelas inseminadas com sêmen congelado (IRC ou ILA), e que as ovelhas inseminadas com sêmen congelado apresentaram desempenho inferior (IRC ou ILA), independente da origem comercial do sêmen, não foi verificada influência da técnica de IA sobre os parâmetros avaliados no presente estudo.

Em relação à qualidade do sêmen, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, órgão regulamentador do comércio de sêmen no Brasil, preconiza valores mínimos estipulados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, de 30% motilidade progressiva (MP), vigor 3 (escala de 0 a 5) e concentração de 40.10^6

sptz/dose inseminante ao descongelamento (CBRA, 1998). No entanto, apesar do laudo dos fornecedores estarem de acordo com as exigências do MAPA (Tab. 1) foi evidenciado que o sêmen congelado de origem comercial (C_1 ou C_2) se constituiu em um fator limitante para obtenção de índices reprodutivos satisfatórios, mesmo quando a deposição foi realizada diretamente nos cornos uterinos (ILA).

Outro aspecto a considerar são os valores de MP após teste de termorresistência (TTR); embora não faça parte do laudo mínimo obrigatório do MAPA, este teste é de grande importância na avaliação da viabilidade do sêmen (Bicudo et al., 2009). Considerando que valores MP após TTR atestado pelos fornecedores foram relativamente baixos (20-25%), e que alguns estudos têm sugerido valores entre 48 e 52% (Bag et al., 2002, 2004), este pode ser outro fator limitante, uma vez que baixos valores de MP após TTR sugerem que o sêmen apresenta capacidade fecundante reduzida.

Níveis séricos de progesterona

Os níveis séricos de progesterona (P_4) foram similares nas ovelhas fertilizadas por inseminação artificial (com retração da cérvice ou por laparoscopia) e por monta natural, com valores médios de 0,71; 1,14; 2,50, 5,17 e 5,92 ng/mL nos dias 0, 3, 5, 12 e 17 após IA/cobertura, respectivamente (Fig. 1).

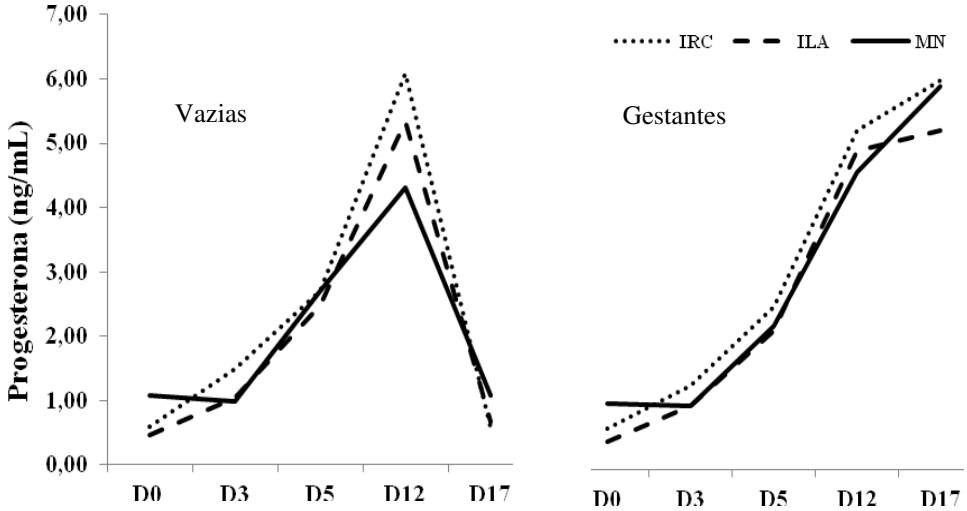

Figura 1. Níveis séricos de progesterona de ovelhas Santa Inês submetidas à monta natural (MN), IA por retração cervical (IRC) ou laparoscópica (ILA) e diagnosticadas vazias ou gestantes (D_{17}, P <0,05 pelo Teste SNK).

Nas ovelhas vazias, o perfil de P_4 também foi semelhante independente da forma de fertilização (IA ou monta natural), sendo evidenciada a curva padrão de P_4 na fase luteal do ciclo estral. Comparando-se ovelhas vazias e gestantes, houve diferença expressiva nos níveis séricos de P_4 no D_{17}, quando as ovelhas vazias apresentaram média <1,0 ng/mL (Fig. 1).

A normalidade do padrão secretório de P_4 é essencial para o aporte de fatores de crescimento e glicoproteínas ligantes necessárias à fase de implantação do embrião, que ocorre entre os dias 13 e 19 da gestação (Reynolds, 1994; Barnes, 2000). Alguns autores sugerem que a manipulação e retração da cérvice no momento da IA podem elevar a produção de $PGF_{2\alpha}$, provocando alterações no ambiente uterino pela migração de neutrófilos e citocinas Th_1, com consequente luteólise e morte embrionária (Wulster-Radcliffe e Lewis, 2002; Wulster-Radcliffe et al., 2004). Entretanto, neste estudo, não foi verificado nenhum indício de influência da IRC na funcionalidade do corpo lúteo, desde a sua formação até 17 dias após a fertilização (período de implantação do embrião). Além disso, a normalidade do funcionamento do corpo lúteo sugere que as possíveis alterações inflamatórias decorrentes da IRC estejam limitadas ao canal cervical, o que poderia comprometer etapas anteriores ao desenvolvimento embrionário, como o transporte espermático e a fertilização, situação potencialmente agravada com o uso de sêmen congelado (Hawk, 1983; Souza et al., 1994; Sayre e Lewis, 1997), resultando em baixas taxas de fertilidade.

CONCLUSÕES

A inseminação artificial por retração cervical em ovelhas Santa Inês, com uso de aplicador expansor e contenção em estação, mostrou-se viável tecnicamente por não interferir no bem-estar das ovelhas nem no padrão secretório de progesterona no ciclo estral subsequente.

A utilização de sêmen congelado disponível comercialmente não proporciona taxa de fertilidade satisfatória, independentemente da técnica de inseminação.

A inseminação artificial transcervical com retração da cérvice possibilita o alcance de taxas de fertilidade similares àquelas obtidas com inseminação intrauterina por laparoscopia.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, H.A. **Probabilidade de ocorrência de chuva no sudeste da Bahia**. Ilhéus/BA: Ed. Ceplac, n.182, 27p., 2001.

ANEL, L., KAABI, M., ABROUG, B., ALVAREZ, M., ANEL, E., BOIXO, J.C., DE LA FUENTE, L.F., DE PAZ, P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v.63, p.1235-1247, 2005.

ÁLVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., KAABI, M., ANEL-LÓPEZ, L., BOIXO, J.C., ANEL, E., ANEL, L., DE PAZ, P. Design and "in vivo" evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. **Anim. Reprod. Sci**., v.131, p.153-159, 2012.

BAG, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at wich straws were punged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci**., v.72, p.175-183, 2002.

BAG, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinetmatics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology,** v.62, p.415-424, 2004.

BARNES, F.L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v.53, p.649-658, 2000.

BICUDO, S.D., RODELLO, L., BITTENCOURT, R.F., MONTEIRO, C.D., CROCOMO, L.F., FALLEIROS, M.B., BISCARDE, C.E.A., OLIVEIRA, T.M. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.6, p.167-181, 2009.

BUCKRELL, B.C., BUSCHBECK, C., GARTLEY, C.J., KROETSCH, T., MCCUTCHEON, W., MARTIN, J., PENNER, W.K., WALTON, J.S. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. **Theriogenology**, v.42, p.601-611, 1994.

CAMPBELL, J.W., HARVEY, T.G., MCDONALD, M.F., SPARKSMAN, R.I. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, v.45, p.1535-1544, 1996.

CARDOSO, E., CRUZ, J.F., FERRAZ, R.C.N., TEIXEIRA NETO, M.R., SANTOS, R.S. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár**., v.4, n.2, p.217-222, 2009.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., KUMMEN, E., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 84, p.359-368, 2004.

FAIR, S., HANRAHAN, J.P., O'MEARA, C.M. DUFFY, P., RIZOS, D., WADE, M., DONOVAN, A., BOLAND, M.P., LONERGAN, P., EVASN, A.C.O. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, v.63, p.1995-2005, 2005.

FERRANTI, J.P.S., BRUN, M.V., ZANELLA, E., MESSINA, S.A., SCHUH, R., SANTOS, F.R., BRAMBATTI, G. Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação artificial intrauterina laparoscópica em ovinos. **Arq Bras Med Vet Zootec**., v.65(3), p.687-693, 2013.

FRAZÃO SOBRINHO, J.M., CASTELO BRANCO, M.A., SOUSA JÚNIOR, A., NASCIMENTO, I.M.R., MOTA, L.H.C.M., CARVALHO, Y.N.T., FERREIRA, S.B., COSTA, D.N.M., MORAES JÚNIOS, F.J., SOUZA, J.A.T. Características do sêmen de carneiros Dorper, Santa Inês e sem padrão racial definido, pré e pós-descongelação, nos períodos chuvoso e seco. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.66, p.969-976, 2014.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., BUCKRELL, B.C. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology,** v.33, p.993-1010, 1990a.

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.1231-1243, 1990b.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **J. Dairy Sci.**, v.66, p.2645-2660, 1983.

KAABI, M., ALVAREZ, M., ANEL, E., CHAMORRO, C.A., BOIXO, J.C., 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**, v.66, p.1876-1883, 2006.

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

KERSHAW-YOUNG, C.M., SCARAMUZZI, R.J., MCGOWAN, M.R., PTSILLIDES, A.A., WHEELER-JONES, C.P.D., KHALID, M. The effect of estradiol on COX-2, EP2 and EP4 mRNA expression and the extracellular matrix in the cervix of the hipogonadotrophic, ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v.73, p.620-628, 2010.

LEETHONGDEE, S., KERSHAW-YOUNG, C.M., SCARAMUZZI, R.J., KHALID, M. Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. **Theriogenology,** v.73, p.1257-1266, 2010.

MATTNER, P.E., ENTWISTLE, K.W., MARTIN, I.C.A. Passage, survival and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. **Aust. J. biol. Sci**., v.22, p.181-187, 1969.

MCKUSICK, B.C., THOMAS, D.L., GOTTFREDSON, R.G., ZELINSKY, R.D., BERGER, Y.M. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. In: **Proceedings** 46th annual spooner sheep day. Madison, WI, p.32–39, 1998.

MOURA, D.S., LOURENÇO, T.T., MOSCARDINI, M.M., SCOTT, C., FONSECA, P.O., SOUZA, F.F. Aspectos morfológicos da cérvice de ovelhas. **Pesq. Vet. Bras**., v.31, p.33-38, 2011.

NAQVI, S.M.K., JOSHI, A., BAG, S., PAREEK, S.R., MITTAL, J.P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Res**, v.29, p.329-333, 1998.

OLIVERA-MUZANTE, J., FIERRO, S., LÓPEZ, V., GIL, J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v.75, p.1232-1238, 2011.

PIERCE, B.N., CLARKE, I.J., TURNER, A.I., RIVALLAND, E.T.A., TILBROO, A.J. Cortisol disrupts the ability of estradiol-17β to induce the LH surge in ovariectomized ewes. **Domest. Anim. Endocrin**., v.36, p.202-208, 2009.

RABASSA, V.R., TABELEÃO, V.C., PFEIFER, L.F.M., SCHNEIDER, A., ZIGUER, E.A., SCHOSSLER, E., SEVERO, N.C., Del Pino, F.A.B., Corrêa, M.N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. **Cienc. Anim. Bras**., v.8, p.127-133, 2007.

REYNOLDS, L.P., GRAZUL-BILSKA, A.T., KILLILEA, S.D., REDMER, D.A. Mitogenic factors of corpora lutes. **Prog. Growth Factor Res**., v.5, p.159-175, 1994.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Anim. Reprod. Sci**, v.37, p.185-249, 1995.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci**, v.62, p.77-111, 2000.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHEL, B.P., MAXWELL, W.M.C. Fertility and its relationship to motility characteristics os spermatozoa in ewes after cervical, transcervical and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **J.Androl**., v.20, p.280-288, 1999.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide.** Version 9.1 ed: Cary. SAS Institute, USA, 2003.

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

SIMPLÍCIO, A.A., FREITAS, V.J.F., FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. Rev.Bras. Reprod. Anim., v.31, p.234-246, 2007.

SOUSA, W.H., LOBO, R.N.B., MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: estado da arte e perspectivas. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, João Pessoa, EMEPA. **Anais**... João Pessoa, PB, p.501-522, 2003.

SOUZA, M.I.L., LUZ, S.L.N., GONÇAVES, P.B.D., NEVES, J.P. Inseminação transcervical com sêmen congelado em ovinos. **Cienc. Rural**, v.24, p. 597-602, 1994.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci**., v.6-61, p.481-492, 2000.

WINDSOR, D.P., SZÉLL, A.Z., BUSCHBECK, C., EDWARD, A.Y., MILTON, J.T.B., BUCKRELL, B.C. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.42, p.147-157, 1994.

WINDSOR, D.P. Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. **Theriogenology**. v43, p.1009-1018, 1995.

WULSTER-RADCLIFFE, 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.; WANG, S.; LEWIS, G.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.

V CAPÍTULO III

Perfil sérico de citocinas IFNγ e IL10 em ovelhas Santa Inês submetidas à inseminação artificial por retração cervical

RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência da inseminação artificial por retração cervical nos níveis séricos de interferon gama (IFNγ) e interleucina 10 (IL10) de ovelhas da raça Santa Inês. Foram utilizadas 24 ovelhas pluríparas sincronizadas (MAP por 12 dias + 200UI de eCG) e submetidas a inseminação artificial e monta natural (MN). A inseminação artificial foi realizada em tempo fixo (55h±1h) por retração cervical (IRC) ou por laparoscopia (ILA). Em função do não-retorno ao estro e diagnóstico de gestação, as ovelhas foram caracterizadas como gestantes, vazias ou com perda embrionária. Para dosagem de progesterona, amostras de sangue foram coletadas nos dias D_0, D_3, D_5, D_{12} e D_{17}, sendo D_0 o dia da IA/MN. As citocinas foram quantificadas do D_0 ao D_{12}. Os níveis de progesterona foram similares, exceto pela redução no D_{17} nas ovelhas vazias ($P<0,05$). Em função do método de reprodução utilizado, não houve diferença entre os grupos para IFNγ e IL10 em nenhum momento avaliado cujas médias foram 642,1, 713,2 e 741,2 pg/mL para IFNγ e de 667,1, 616,8 e 721,1 pg/mL para IL10 nas ovelhas submetidas a IRC, ILA ou MN, respectivamente. Quanto ao *status* fisiológico, ovelhas com perda embrionária apresentaram menores níveis séricos de IFNγ e IL10 que ovelhas gestantes e vazias, independentemente do método reprodutivo utilizado. As médias de IFNγ foram 769,1, 555,7 e 714,9 pg/mL, e de IL10 foram 713,8, 578,7 e 699,3 pg/mL para ovelhas gestantes, com PE e vazias, respectivamente ($P<0,01$). Níveis séricos baixos de IFNγ e IL10 não são suficientes para suportar a gestação, entretanto, a inseminação transcervical com retração da cérvice não altera o perfil sérico destas citocinas.

Palavras-chave: implantação, inflamação, inseminação transcervical, perda embrionária.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of artificial insemination by cervical retraction in serum levels of interferon gamma (IFNγ) and interleukin 10 (IL10) of Santa Inês ewes. We used 24 synchronized pluriparous ewes (MAP for 12 days + eCG 200 IU) and subjected to artificial insemination and natural mating (MN); artificial insemination was performed at a fixed time (55h ± 1h) by cervical retraction (RCI) or laparoscopy (LAI). Due to the non-return to estrus and pregnancy diagnosis, ewes were characterized as pregnant, non-pregnant or with embryonic loss. For progesterone dosage, blood samples were collected on days D_0, D_3, D_5, D_{12} and D_{17}, (D_0 = IA/MN). Cytokines were quantified from D_0 to D_{12}. Progesterone levels were similar, except for the decrease in non pregnant ewes at D_{17} ($P < 0.05$). Regarding to reproductive method used, there was no difference between groups for IFNγ and IL-10 at any time, the averages were 642.1, 713.2 and 741.2 pg/mL for IFNγ and 667.1, 616.8 and 721.1 pg/ml for IL-10 in RCI, LAI and NM, respectively. Regarding to physiological status, ewes with embryonic loss (EL) had lower serum levels of IFNγ and IL-10 than pregnant and non pregnant ewes, regardless of reproductive method used; the averages of IFNγ were 769.1, 555.7 and 714.9 pg/ml, and IL-10 were 713.8, 578.7 and 699.3 pg/ml for pregnant, non pregnant and EL ewes, respectively ($P < 0.01$). In conclusion, low serum levels of IFNγ and IL-10 are not sufficient to support pregnancy, but artificial insemination with cervical retraction does not alter the profile of serum cytokines.

Keywords: embryo loss, implantation, inflammation, transcervical insemination

INTRODUÇÃO

Na espécie ovina, a inseminação artificial (IA) intrauterina com uso de sêmen congelado ainda apresenta entraves. Os melhores resultados de fertilidade são obtidos com laparoscopia, porém, devido aos elevados custos e necessidade de procedimento anestésico e profissional especializado, este modelo não é difundido em larga escala (Windsor, 1995). Para contornar essas limitações foi desenvolvida a técnica de inseminação transcervical com o objetivo de possibilitar a deposição intrauterina do sêmen transpassando os anéis cervicais (Halbert et al., 1990).

Por outro lado, a tortuosidade da cérvice ovina e a ampla variedade de resultados de fertilidade têm limitado a difusão desta técnica (Sayre e Lewis, 1997; Kershaw et al., 2005). Nesse sentido, diversos estudos buscaram alternativas para melhorar o desempenho da IA transcervical, envolvendo desde fármacos dilatadores de cérvice, como oxitocina (Sayre e Lewis, 1996), PGE_2 (Leethongdee et al., 2007) e carazolol (Gündüz et al., 2010), até modelos de aplicadores adaptados à anatomia cervical (Aral et al., 2010; Alvarez et al., 2012).

Alguns estudos sugerem que a manipulação cervical pode ocasionar danos teciduais, alterando o ambiente uterino pela migração de células pró-inflamatórias, com consequente perda de fertilidade ou morte embrionária (Hawk, 1983, Campbell et al., 1996; Wulster-Radcliffe et al., 2004). O sistema imunológico atua de forma decisiva na reprodução, uma vez que exerce função de proteção contra patógenos externos e de modulação no processo de não-rejeição do concepto, o qual pode ser considerado um aloenxerto devido ao material genético paterno (Shechter et al., 2013).

Segundo Rice e Chard (1998), citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, heterogêneas, mediadores de origem animal, pleiotrópicas e peso molecular entre 5.000 e 100.000 Da. São formadas em cascata e regulam a produção de outras citocinas, podendo aumentar ou atenuar a resposta inflamatória.

As citocinas T*helper*1 (Th1) são consideradas pró-inflamatórias e T*helper*2 (Th2), anti-inflamatórias. No trato reprodutivo, são utilizadas para comunicação entre as células, não somente secretadas pelo embrião, mas também por linfócitos do sangue periférico, macrófagos, células endometriais e da tuba uterina (Schäfer-Somi, 2003).

O interferon gama (IFNγ) é uma das principais citocinas secretadas pelas células Th1. Monócitos ativados secretam interleucinas (IL) pró-inflamatórias (IL12, IL15,

IL18) que estimulam células *natural killer* (NK) e células T CD4+ e CD8+, como consequência, secreções parácrinas e sistêmicas de IFNγ ativam imunidade citolítica e citotóxica (Pólgar et al., 1996; Dorman e Holland, 2000). Por outro lado, a IL10 é uma importante citocina Th2 secretada por diversas células, imunes ou não imunes, que induz produção de anticorpos através de células B e regula a liberação de citocinas Th1, exercendo, portanto, uma ação imunossupressora e tolerogênica (Kalkunte et al., 2011; Fan et al., 2011).

Muitos estudos indicam que algum grau de inflamação sistêmica ou uterina seja necessário para um processo normal de implantação do embrião, o que demanda uma relação Th1/Th2 bem sucedida no controle do sistema imune materno contra os tecidos do concepto (Bazer et al., 2009; Lin et al., 2009). Alterações teciduais ou sistêmicas que desequilibrem acentuadamente este balanço Th1/Th2 podem provocar desordens reprodutivas, como infertilidade, perda embrionária e aborto (Krakowsiki et a., 2010; Makrigiannakis et al., 2011). Diante da possibilidade de reações inflamatórias adicionais, resultantes da manipulação da cérvice, objetivou-se avaliar a influência da técnica de inseminação artificial por retração cervical sobre os níveis séricos de IFNγ e IL10 em ovelhas Santa Inês.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamentos

Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob o protocolo nº 68/2014.

O estudo se realizou na Estação Experimental Fazenda Almada, setor de ovinocultura, município de Ilhéus-BA (14º47’20”S, 39º02’56”O), com precipitação pluviométrica anual média de 1.988 mm, temperatura 23,4 ± 1,5ºC e umidade relativa 85,4 ± 4,0% (Almeida, 2001). Foram utilizadas 24 ovelhas pluríparas da raça Santa Inês de rebanhos comerciais, com idade entre quatro e oito anos, peso vivo médio de 52,20 ± 4,60 kg e escore de condição corporal médio de 3,4 ± 0,4 (escala 1-5), dois carneiros Santa Inês, além de quatro machos vasectomizados. As três categorias foram manejadas separadamente em piquetes de *Brachiaria humidicola* das 8:00h às 16:00h e suplementadas com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e concentrado à base de milho e soja (15% PB) na quantidade média de 400g/cab/dia; sal mineral (Guabiphos

ovinos AE®, Guabi, Brasil) e água *ad libitum*. As ovelhas foram submetidas a inseminação artificial por retração cervical (IRC), laparoscópica (ILA) ou monta natural (MN). O protocolo hormonal consistiu em esponjas intravaginais contendo 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Brasil), mantidas por 12 dias; no momento da retirada das esponjas foram aplicados IM 200 UI de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil). A IA foi realizada 55±1 h após a aplicação do eCG. A monta natural foi realizada no ciclo estral subsequente ao protocolo hormonal, após identificação do estro com auxílio de rufiões vasectomizados, sendo utilizados reprodutores aprovados por meio exame andrológico.

A IRC procedeu-se com as ovelhas mantidas em estação em um brete. Após higienização da região vulvar, utilizou-se um espéculo vaginal de 15 cm e fonte de luz para visualização do óstio cervical; realizou-se a retração da cérvice até a abertura vulvar e fixação por meio de duas pinças Allis de 25 cm de comprimento; posteriormente foi utilizado um aplicador metálico de 12 cm contendo um mandril (Aplicador expansor ovino®, Alta Genetics, Brasil) para transpor os anéis cervicais, tanto quanto possível; em seguida foi introduzida uma palheta de 0,25 mL contendo o sêmen congelado disponível comercialmente.

Para a execução da ILA, as ovelhas foram submetidas a um jejum prévio de 24h; após antissepsia e tricotomia da região abdominal, as ovelhas foram contidas em maca especial, em decúbito dorso-oblíquo a 60º com porção caudal suspensa, procedendo-se a anestesia local com lidocaína 2% (Anestésico L®, Pearson, Brasil) em dois pontos abdominais próximos à localização dos cornos uterinos; após duas pequenas incisões, realizou-se a punção de trocáteres, um para a utilização do laparoscópio (Karl Storz®, Germany), e outro para insuflação com Ar Ambiente e uso de manipulador para localização do útero e posterior introdução de pipeta inseminante com extremidade perfurante, uma vez localizados os cornos uterinos, procedeu-se a inseminação com o sêmen congelado, utilizando metade da dose (0,25mL) em cada corno uterino.

Dosagem de progesterona (P_4)

Foram coletadas amostras de sangue das ovelhas através de venopunção pela veia jugular com auxílio de agulhas e tubos coletores a vácuo sem anticoagulante (BD Vacutainer®, Inglaterra), nos dias 0, 3, 5, 12 e 17 para dosagem de progesterona (P_4), sendo o “dia 0” referente à realização da IA ou ocorrência do estro na MN. As amostras

foram centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos e o soro obtido foi armazenado em freezer a – 20ºC. A dosagem hormonal foi realizada com as amostras em duplicata por Radioimunoensaio no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense, RJ. Para quantificar a P4, foi utilizado o kit RIA IM1188 (Beckman Coulter®, Immunotech, República Tcheca), com sensibilidade de 0,05 ng/mL e coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio de 6,5% e 7,2%, respectivamente.

Índices reprodutivos e *status* fisiológico

O não-retorno ao estro foi determinado com auxílio de rufiões até 21 dias pós IA ou MN; o diagnóstico de gestação ou visualização de vesícula sem embrião foi realizado por ultrassonografia (Falco Vet 100, Pie Medical) com transdutor retal de 8 MHz aos 35 dias pós IA ou MN. Em função destes parâmetros, as ovelhas foram classificadas como vazias, gestantes ou com perda embrionária (PE).

Dosagem de IFNγ e IL-10

As amostras de soro dos dias 0, 3, 5 e 12 foram utilizadas em duplicata para a detecção das citocinas IFNγ e IL-10, através da técnica de ELISA. Com uso de kits comerciais específicos para ovinos (Neobiolab, USA), placas de poliestireno de 96 poços foram previamente sensibilizadas com anticorpo anti-citocina. As amostras de controle das citocinas foram utilizadas nas concentrações de 1000 pg/mL e 50 pg/mL para compor a curva padrão; 100 µL das amostras de soro previamente diluídas 1:10 em tampão de amostra e 100 µL das curvas padrão foram adicionadas a microplaca e concomitantemente 30 ul de conjugado da citocina correspondente com peroxidase. Após uma hora de incubação a 37°C em atmosfera úmida, realizou-se a lavagem da placa por cinco vezes em lavadora automática (Termo Scientific, USA) com PBS 0,05% Tween e foi adicionada 50 µL da solução de substrato (TMB – Tetrametilbenzidina). A microplaca foi incubada em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 molar e a leitura espectrofotométrica foi feita na leitora de microplacas (Thermoplate), no comprimento de onda de 450 nm.

Análise estatística

Foram realizadas avaliações entre os grupos submetidos à IA por retração cervical, laparoscópica ou monta natural, bem como entre os *status* fisiológicos gestantes, vazias ou com perda embrionária. Os dados referentes às concentrações de progesterona foram analisados e as médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (PROC GLM, SAS, versão 9.1); as diferenças foram consideradas significativas com $P<0,05$. Os dados referentes aos níveis séricos das citocinas (IFNγ e IL-10) foram analisados e as médias comparadas pelo teste de Tuckey (software Graph Prism 5.0); as diferenças foram consideradas significativas com $P<0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Níveis séricos de progesterona

A curva de secreção de progesterona obedeceu ao padrão fisiológico esperado, sem influência do método reprodutivo utilizado. Os níveis séricos de progesterona (P4) foram similares até o D_{12} nas ovelhas vazias, gestantes e com perda embrionária (PE), com valores médios de 0,75; 1,14; 2,28 e 5,01 ng/mL no D_0, D_3, D_5 e D_{12}, respectivamente. No D_{17}, os níveis de P_4 nas ovelhas gestantes e com PE mantiveram-se elevados (5,98 e 5,32 ng/mL) e foram maiores que nas ovelhas vazias ($P<0,05$), nas quais se observou redução acentuada para 0,63 ng/mL (Fig. 1).

A ocorrência da luteólise foi evidenciada pela acentuada redução dos níveis de P_4 entre o D_{12} e D_{17} nas ovelhas vazias, diferentemente do que ocorreu nas ovelhas gestantes. Segundo Bazer et al. (2008), em ovelhas vazias, é esperada a luteólise entre os dias 15 e 16 do ciclo estral, devido à secreção endometrial de $PGF_{2\alpha}$; por outro lado, a presença de um concepto gera sinalização antiluteolítica através da secreção de IFNτ, proporcionando o reconhecimento materno. No caso das ovelhas com PE, o nível elevado de P_4 até o D_{17} sugere presença de embrião viável, capaz de secretar IFNτ e evitar a luteólise. A combinação de P_4 e IFNτ é positiva para ativação de genes estimulados por interferons (ISG), os quais estão envolvidos em funções como transporte de nutrientes, atividade antiviral e proteção dos tecidos do concepto frente às células imunes maternas (Bazer et al., 2009).

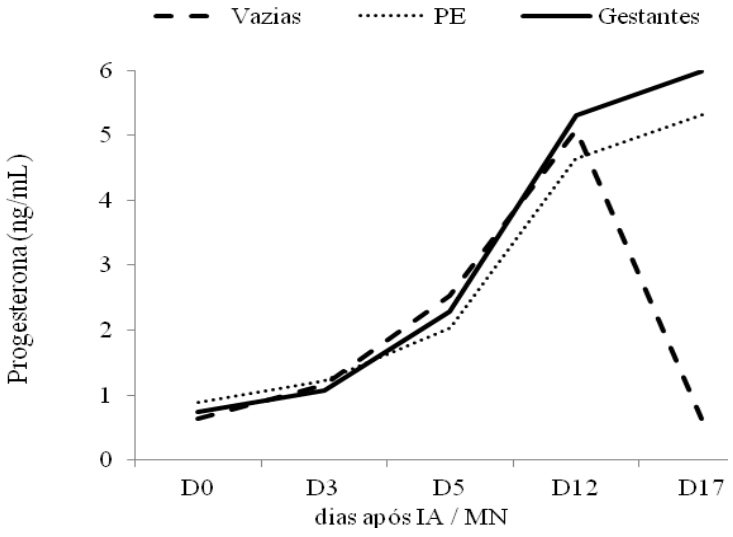

Figura 1. Níveis séricos de progesterona de ovelhas Santa Inês vazias, gestantes ou com perda embrionária (PE), independentemente da técnica reprodutiva utilizada. * P<0,05 pelo teste SNK.

Níveis séricos de citocinas

Os níveis séricos de citocinas foram similares, com médias de 642,1, 713,2 e 741,2 pg/mL para IFNγ e de 667,1, 616,8 e 721,1 pg/mL para IL10 nas ovelhas submetidas a inseminação artificial transcervical com retração da cérvice (IRC), por laparoscopia (ILA) ou monta natural (MN), respectivamente (Fig. 2). Dentro do grupo IRC foi observada maior variação, com valores mínimos e máximos em 44,0 e 890,0 pg/mL, respectivamente, em relação a MN (368,0 e 860,0 pg/mL) e ILA (220,0 e 907,0 pg/mL).

Considerando que o momento do estro é fisiologicamente caracterizado por uma cascata inflamatória local para dilatação cervical (Mitchell et al, 2002), a manipulação da cérvice durante a IA, com possíveis lesões teciduais, poderia potencializar esta inflamação (Campbell et al., 1996), ocasionando maior ativação de monócitos, secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL12) e consequente liberação de IFNγ por células NK e linfócitos T (Bataille et al, 2004; Yu et al., 2006). Neste estudo, no entanto, não foi verificado indício de reação inflamatória mais intensa após a realização da IRC, uma vez que os níveis séricos de IFNγ se mantiveram similares aos encontrados nas ovelhas submetidas à ILA ou MN.

Da mesma forma, a ausência de diferenciação nos níveis séricos de IL10 nos três grupos de ovelhas sugere que caso tenham ocorrido reações inflamatórias adicionais, em consequência da IRC, estas não teriam sido suficientes para ativação da resposta Th2, visto que esta situação é uma ação regulatória da resposta Th1 (Ginsburg et al., 2005). Em casos de maior atividade pró-inflamatória Th1, a relação IFNγ/IL10 sistêmica aumenta, ocasionando, inclusive, inviabilidade de gestação (Calleja-Agius et al., 2011). Assim, a não influência da IRC é reforçada pela proporção fisiológica de IFNγ/IL10 nas ovelhas dos três tratamentos (0,96; 1,15 e 1,03, para IRC, ILA e MN, respectivamente).

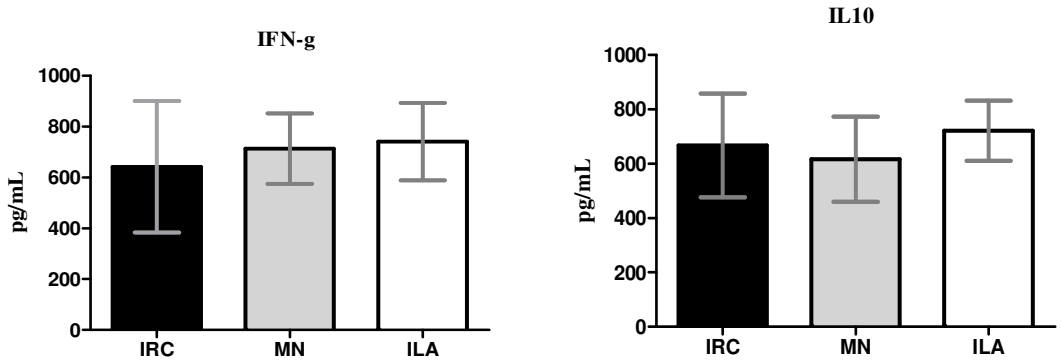

Figura 2. Níveis séricos de interferon gama (IFN-g) e interleucina 10 (IL-10) de ovelhas Santa Inês submetidas à inseminação artificial por retração cervical (IRC, n=36), laparoscópica (ILA, n=32) ou monta natural (MN, n=22). Todas as amostras analisadas em duplicata pela técnica de ELISA. P>0,01 pelo teste Tuckey.

Os níveis séricos de IFNγ e IL10 ao longo do ciclo estral subsequente foram similares após IRC, ILA ou MN em todos os dias avaliados (P>0,05). Também foi observada regularidade do perfil sérico destas citocinas no referido período (Fig. 3).

Alguns autores sugerem que a manipulação e retração da cérvice no momento da IA pode elevar a produção de $PGF_{2\alpha}$, de tal modo que ocorra invasão de neutrófilos ao tecido luteal, o que resulta em maior secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais, o IFNγ, e consequente luteólise e morte embrionária (Wulster-Radcliffe et al., 2004; Weems et al., 2006).

Considerando as ovelhas avaliadas, a regularidade dos níveis séricos de IFNγ e IL10 nos 12 dias subsequentes a inseminação artificial (P>0,05), em adição à

similaridade no perfil sistêmico dessas citocinas, especialmente quando confrontada com a monta natural, fica evidente que a IA com retração da cérvice realizada com a ovelha em estação e baixa intensidade de estresse, não induz a reação inflamatória que possa comprometer a viabilidade do embrião.

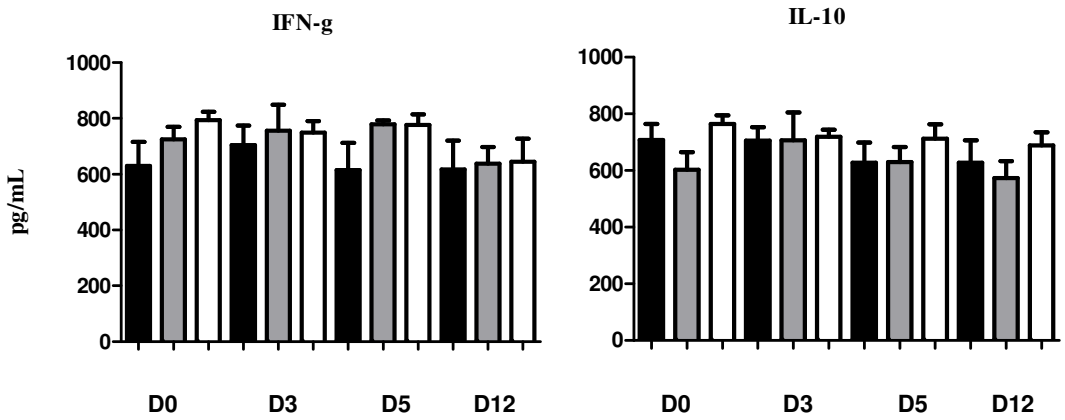

Figura 3. Níveis séricos de interferon gama (IFN-g) e interleucina 10 (IL-10) de ovelhas Santa Inês após inseminação artificial por retração cervical (36, ■), monta natural (22, ■) ou IA por laparoscopia (32, □). Todas as amostras analisadas em duplicata pela técnica de ELISA P>0,01 pelo teste Tuckey.

Em relação ao *status* fisiológico, foi demonstrado que ovelhas que sofreram perda embrionária apresentaram níveis séricos de citocinas inferiores aos apresentados por ovelhas gestantes e vazias (P<0,01), independentemente se foram inseminadas ou cobertas naturalmente. Os níveis de IFNγ foram 769,1, 555,7 e 714,9 pg/mL, e de IL10 foram 713,8, 578,7 e 699,3 pg/mL para ovelhas gestantes, com PE e vazias, respectivamente (Fig. 4). A proporção IFNγ/IL10 ficou em 1,07, 0,96 e 1,02, na mesma ordem.

As principais fontes secretoras de IFNγ são as células NK, com a finalidade de proporcionar atividade antiviral e resposta imune celular contra patógenos (Pólgar et al., 1996). No entanto, estudos indicam um papel central do IFNγ no sítio de implantação do embrião, envolvendo o remodelamento das artérias espirais deciduais (Ashkar e Croy, 2001). A carência de IFNγ, causada por insuficiência de células NK, ocasiona anormalidades neste remodelamento, como espessamento dos vasos deciduais e redução do lúmen vascular (Guimond et al., 1998; Lash e Bulmer, 2011).

Independentemente da técnica reprodutiva utilizada, a perda embrionária foi observada em todas as ovelhas com níveis séricos de IFNγ inferiores a 600 pg/mL, sugerindo que níveis dessa citocina inferiores a este valor não são suficientes para proporcionar o ambiente decidual de implantação, inviabilizando a gestação após o D_{17}.

No tocante a IL10, os menores níveis observados nas ovelhas com PE sinalizam que estas podem apresentar uma atividade tolerogênica menos eficiente do que as demais ovelhas, especialmente aquelas que mantiveram a gestação. A IL10 exerce papel crucial na gestação devido a sua atividade imunossupressora e regulatória com outros moduladores intrauterinos (Murphy et al., 2005). A insuficiência ou ausência de IL10 pode levar infertilidade, falhas na implantação do embrião e abortos recorrentes em murinos (Murphy et al., 2005; Christiansen et al., 2006) e em mulheres (Ginsburg et al., 2005; Ozkan et al., 2014).

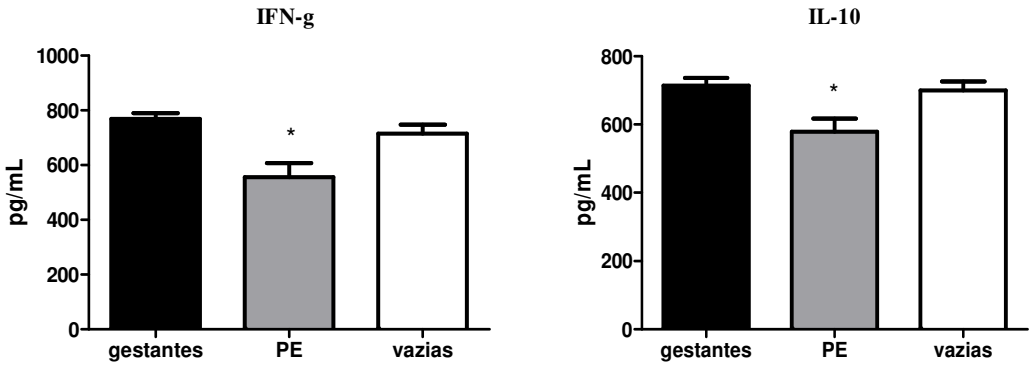

Figura 4. Níveis séricos de interferon gama (IFN-g) e interleucina 10 (IL-10) de ovelhas Santa Inês gestantes (n=34), com perda embrionária (PE, n=23) ou vazias (n=33) após inseminação artificial com retração da cérvice, por laparoscopia ou monta natural. Todas as amostras analisadas em duplicata pela técnica de ELISA. * P<0,01 pelo teste Tuckey.

Por outro lado, estudos envolvendo infertilidade demonstram que a proporção IFNγ/IL10 tende a aumentar, por ação da imunidade Th1 (Lee et al., 2005; Calleja-Agius et al., 2011). Contudo, observou-se que a relação IFNγ/IL10 foi balanceada e similar nos três grupos, a despeito dos níveis séricos menores das duas citocinas. Este fato sugere que as ovelhas com PE, embora em condições aparentemente fisiológicas, não dispunham de sistema imune compatível com a gestação.

CONCLUSÕES

A inseminação artificial por retração cervical, realizada com a ovelha em estação e com baixa intensidade de estresse, não altera o perfil sérico de citocinas IFNγ e IL10, portanto, não induz a reação inflamatória que possa comprometer o desenvolvimento da gestação.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., KAABI, M., ANEL-LÓPEZ, L., BOIXO, J.C., ANEL, E., ANEL, L., DE PAZ, P. Design and "in vivo" evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. **Anim. Reprod. Sci**., v.131, p.153-159, 2012.

ARAL, F., YAVUZER, Ü., ZONTURLU, A.K. The effect of air pressure with cervical artificial insemination on the fertility of Awassi ewes synchronized with PGF2α. **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.**, v.16, p.37-41, 2010.

ASHKAR, A.A., CROY, B.A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. **Semin. Immunol**., v.13, p.235-241, 2001.

BATAILLE, N.T., DUBANCHET, S., COULOMB-L'HERMINE, A., DURAND-GASSELIN, I., FRYDMAN, R., CHAOUAT, G. A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. **Fertil. Steril**., v.81, p.59-65, 2004.

BAZER, F.W., BURGHARDT, R.C., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E., WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reprod. Biol**., v.8, p.179-211, 2008.

BAZER, F.W., SPENCER, T.E., JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R., WU, G. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v.138, p.195-209, 2009.

CAMPBELL, J.W., HARVEY, T.G., MCDONALD, M.F., SPARKSMAN, R.I. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, v.45, p.1535-1544, 1996.

CALLEJA-AGIUS, J., MUTTUKRISHNA, S., PIZZEY, A.R., JAUNIAUX, E. Pro- and anti-inflammatory cytokines in threatened miscarriages. **Am. J. Obstet. Gynecol**., v.205, p.8-16, 2011.

CHRISTIANSEN, O.B., NIELSEN, H.S., KOLTE, A.M. Inflammation and miscarriage. **Semin. Fetal. Neonat**. M., v.11, p.302-308, 2006.

DORMAN, S.E., HOLLAND, S.M. Interferon-γ and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine Growth F. R**, v.11, p.321-333, 2000.

FAN, D., X., DUAN, J., LI, M.Q., XU, B., LI, D.J., JIN, L.P. The decidual gamma-delta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy. **Clin. Immunol**., v.141, p.284-292, 2011.

GINSBURG, E.S., XIAO, L., GARGIULO, A.R., KUNG, F.T., POLITCH, J.A., SCHUST, D.J., HILL, J.A. T-helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in successful in vitro fertilization – embryo transfer. **Fertil. Steril**., v.83, p.1659-1664, 2005.

GUIMOND, B.M.J., WANG, B., CROY, B.A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tgε26 mice. **J. Exp. Med**., v.187, p.217-223, 1998.

GÜNDÜZ, M.C., TURNA, Ö., CIRIT, Ü., UÇMAK, M., TEK, Ç., SABUNCU, A., BACINOGLU, S. Lambing rate and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. **Anim. Reprod. Sci**., v.118, p.32-36, 2010.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., BUCKRELL, B.C. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology,** v.33 , p.993-1010, 1990.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **J. Dairy Sci**., v.66, p.2645-2660, 1983.

KALKUNTE, S., NEVERS, T., NORRIS, W.E., SHARMA, S. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. **J. Reprod. Immunol**., v.88, p.165-169, 2011.

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

KRAKOWSKI, L., KRAWCZYK, C.H., WRONA, Z., DĄBROWSKI, R., JAROSZ, L. Levels of selected T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of mares which experienced early embryonic death. **Anim. Reprod. Sci**., v.120, 71-77, 2010.

LASH, G.E., BULMER, J.N. Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? **J. Reprod. Immunol**., v.88, p.156-164, 2011.

LEE, J., CHOI, B.C., CHO, C., HILL, J.A., BAEK, K.H., KIM, J.W., 2005. Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of Th1 immunity. **Fertil Steril,** v. 83, 1047-1049, 2005.

LEETHONGDEE, S., KHALID, M., BHATTI, A., PONGLOWHAPAN, S., KERSHAW, C.M., SCARAMUZZI, R.J. The effects of prostaglandin E analogue misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. **Theriogenology,** v.67, p.767-777, 2007.

LIN, Y., NAKASHIMA, A., SHIMA, T., ZHOU, X., SAITO, S. Toll-like receptor signaling in uterine natural killer cells – role in embryonic loss. **J. Reprod. Immunol**., v.83, p.95-100, 2009.

MAKRIGIANNAKIS, A., PETSAS, G., TOTH, B., RELAKIS, K., JESCHKE, U. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. **J. Reprod. Immunol**., v.90, p.96-104, 2011.

MITCHELL, S.E., ROBINSON, J.J., KING, M.E., MCKELVEY, W.A.C., WILLIAMS, L.M. Interleukin 8 in the cervix of non-pregnant ewes. **Reproduction,** v.124, p.409-416, 2002.

MURPHY, S.P., FAST, L.D., HANNA, N.N., SHARMA, S. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL10-null mice. **J. Immunol**., v.175, p.4084-4090, 2005.

OZKAN, Z.S., DEVECI, D., KUMBAK, B., SIMSEK, M., ILHAN, F., SEKERSIOGLU, S., SAPMAZ, E. What is the impact of Th1/Th2 ratio, SOCS3, IL17 e IL35 levels in unexplained infertility? **J. Reprod. Immunol**., v.103, p.53-58, 2014.

PÓLGAR, K., YACONO, P.W., GOLAN, D.E, HILL, J.A. Immune interferon gamma inhibits translational mobility of a plasma membrane protein in preimplantation stage mouse embryos: A T-helper 1 mechanism for immunologic reproductive failure. **Am. J. Obstet. Gynecol**., v.174, p.282-287, 1996.

RICE, A., CHARD, T. Cytokines in Implantation. **Cytokine Growth F. R**., v.9, p.176-185, 1998.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide.** Version 9.1 ed: Cary. SAS Institute, USA, 2003.

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

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

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Anim. Reprod. Sci.,** v.75, p.73-94, 2003.

SHECHTER, R., LONDON, A., SCHWARTZ, M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educacional gates. **Nat. Rev. Immunol.**, v.13, p.206-218, 2013.

WEEMS, C.W., WEEMS, Y.S., Randel, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Vet. J**., v.171, p.206-228, 2006.

WINDSOR, D.P. Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. **Theriogenology**. v43, p.1009-1018, 1995.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; WANG, S.; LEWIS, G.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.

YU, J., WEI, M., BECKNELL, B., TROTTA, R., LIU, S., BOYD, Z., JAUNG, M.S., BLASER, B.W., SUN, J., BENSON-JR, D.M., MAO, H., YOKOHAMA, A., BHATT, D., SHEN, L., DAVULURI, R., WEINSTEIN, M., MARCUCCI, G., CALIGIURI, M.A. Pro- and Anti-inflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. **Immunity,** v.24, p.575-590, 2006.

VI CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de inseminação artificial transcervical com retração da cérvice (IRC), com uso de aplicador expansor e contenção em estação, possibilita a transposição dos anéis cervicais em torno de 30 segundos com pouca interferência no bem-estar das ovelhas;

A IRC proporciona a deposição intrauterina do sêmen na maioria das ovelhas;

A IRC associada ao sêmen congelado disponível no mercado não proporciona taxa de fertilidade satisfatória; no entanto, proporciona taxas similares as obtidas com IA por laparoscopia.

A manipulação da cérvice durante a IRC ocasiona reação inflamatória local no epitélio cervical, que se mostra mais intensa 24 horas após a manipulação; entretanto, em 72 horas, o tecido epitelial apresenta-se em reorganização, com um quadro inflamatório atenuado.

A reação inflamatória gerada no tecido cervical pela IRC não compromete o padrão secretório de progesterona do ciclo estral subsequente;

Os danos teciduais da cérvice ovina causados pela IRC não altera o perfil sérico fisiológico das citocinas IFNγ e IL10 por um período equivalente a fase luteal do ciclo estral subsequente, portanto, não provoca reação inflamatória que possa comprometer o desenvolvimento da gestação;

Ovelhas que apresentam níveis séricos de IFNγ e IL10 fisiologicamente baixos não são capazes de suportar uma gestação, independentemente do método de fertilização ser por inseminação artificial ou por monta natural;

O método de inseminação artificial transcervical com retração da cérvice, uso de aplicador expansor e contenção em estação pode ser considerado viável tecnicamente quanto a sua praticidade de execução e quanto ao não comprometimento da fisiologia e imunologia reprodutiva em ovelhas Santa Inês.

ANEXO – Comprovação de submissão do Artigo científico "**Behavior, endocrine and histological parameters of synchronized Santa Inês ewes submitted to artificial insemination by cervical retraction"** para o periódico *Small Ruminant Research.*

---------- Forwarded message ----------
From: **RUMIN** <rumin@elsevier.com>
Date: 2015-01-28 7:57 GMT-02:00
Subject: A manuscript number has been assigned: Rumin-D-15-6634
To: cruzjurandir@gmail.com

Ms. No. Rumin-D-15-6634
Behavior, endocrine and histological parameters of synchronized Santa Inês ewes submitted to artificial insemination by cervical retraction

Dear Mr. Cruz,

Your manuscript has been assigned the following reference number: **Rumin-D-15-6634**

You will be able to check the progress of your paper by logging in as Author at http://ees.elsevier.com/rumin/

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Thank you for submitting your manuscript to Small Ruminant Research.

Kind regards,

Small Ruminant Research

--
Jurandir Ferreira da Cruz
Departamento de Fitotecnia e Zootecnia
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia