

## **ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR AS TAXAS DE PREENHEZ COM SÊMEN OVINO CONGELADO**

Luana Zanferari<sup>1</sup>, Renata Casali<sup>2</sup>, Guilherme dos Santos<sup>3</sup>, Gabriel Camargo<sup>3</sup>, Rafael Toazza<sup>4</sup>, Alceu Mezzalira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – bolsista PIVIC/UDESC.

<sup>2</sup>Doutoranda do programa de Pós-graduação em Ciência Animal - CAV.

<sup>3</sup>Acadêmico do Curso Medicina Veterinária – CAV.

<sup>4</sup>Mestrando do programa de Pós-graduação em Ciência Animal - CAV.

<sup>5</sup>Orientador, Departamento de Medicina Veterinária - CAV – alceu.mezzalira@udesc.br.

Palavras chave: plasma liofilizado. Trealose. Criopreservação. Sincronização.

A criopreservação de sêmen é uma das mais importantes biotécnicas disponíveis para a indústria animal, porém em ovinos, a membrana espermática é alterado durante o congelamento, sendo necessários ajustes para melhorar sua eficiência. Em trabalho prévio, a adição de 100 mM de Trealose associada ao PSE, mostrou-se nociva aos espermatozoides, possivelmente por excessiva osmolaridade. Desta forma buscou-se avaliar uma menor concentração. Por outro lado, o emprego de sêmen congelado deve ser associado a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A IATF em ovelhas é baseada no uso de dispositivos intra vaginais de progesterona por 12-14 dias (protocolo longo) ou 5 a 7 dias (protocolo curto). O protocolo curto, hipoteticamente, permite obter um folículo pré-ovulatório mais jovem e saudável, reduzindo a possibilidade de ovulação de folículos persistentes. Este estudo avaliou a adição de trealose e da associação trealose + plasma seminal equino liofilizado (PSE) ao diluente de congelamento, bem como o uso de protocolo curto versus protocolo longo. O PSE foi obtido de um *pool* de ejaculados de garanhões saudáveis, submetidos a sucessivas centrifugações e liofilizado. O sêmen ovino foi obtido de 2 carneiros da raça Lacaune, sendo que os ejaculados constituíram um *pool*, que foi fracionado em 3 grupos e diluídos com Tris-gema glicerolado. A osmolaridade dos distintos grupos foi ajustada para próximo de 320 mOsm. Foram constituídos os tratamentos: Controle: sêmen + diluente. Trealose: sêmen + 50 mM de trealose + diluente. Trealose + PSE: sêmen + 50 mM de trealose + PSE equivalente a 300 µg de proteína + diluente. As doses de 100 milhões de espermatozoides foram envasadas em palhetas 0,25 mL, resfriadas e congeladas no equipamento TK3000 (10 repetições). Após o descongelamento, as avaliações consistiram em Teste de Termo resistência (TTR), Teste Hiposmótico (HOST), Teste de migração ascendente “Swim Up” e Morfologia Espermática. No segundo experimento, 39 ovelhas Lacaune foram divididas ao acaso em 2 grupos. O grupo 1 recebeu o implante de progesterona (D0-progespon®) por 12 dias, enquanto o grupo 2 recebeu o implante 6 dias após o implante do grupo 1. Na retirada dos implantes, ambos os grupos receberam 500UI de eCG e 0,125 mg de prostaglandina. A cobertura foi realizada 48 horas após a retirada dos implantes, sendo o diagnóstico de gestação realizado por ultrassonografia, 30 dias após. Os resultados de motilidade e vigor obtidos logo após o descongelamento e durante o TTR, estão sumarizados na Tabela 01. Não houve diferença na

motilidade espermática entre os grupos Controle e Trealose, que foram superiores ao tratamento Trealose + PSE. O vigor foi semelhante entre os tratamentos, no tempo zero e apresentou redução durante o TTR no grupo Trealose + PSE.

**Tab. 1** Percentual de motilidade progressiva e vigor (escala de 1-5) de sêmen ovino congelado em Tris gema glicerolado (Controle, adicionado de 50mM Trealose, ou Trealose + 300µg plasma seminal equino liofilizado (PSE) com osmolaridade ajustada para 320 mOsm. As avaliações foram realizadas logo após o descongelamento (Tempo zero) ou com 1, 2 e 3 horas do teste de termo resistência (TTR).

Tratamentos	Tempo Zero.	TTR 1h	TTR 2h	TTR 3h
<b>MOTILIDADE</b>				
Controle	36,7 <sup>a</sup>	34,2 <sup>ab</sup>	32,1 <sup>ab</sup>	30,4 <sup>a</sup>
Trealose	36,7 <sup>a</sup>	35,8 <sup>a</sup>	32,9 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>
Trealose+PSE	33,8 <sup>b</sup>	31,7 <sup>b</sup>	28,8 <sup>b</sup>	27,5 <sup>b</sup>
<b>VIGOR</b>				
Controle	3,3 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>
Trealose	3,3 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>
Trealose+PSE	3,2 <sup>a</sup>	2,9 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença para motilidade ou vigor, pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

Na avaliação morfológica, o grupo Trealose+PSE teve maior percentual de espermatozoides normais (96,8%) em relação ao Controle (91,1%) e Grupo Trealose (91,5%). No teste hiposmótico, a integridade de membrana espermática do grupo Controle (28,4%) e Trealose (23,7%) foram superiores ao grupo Trealose+PSE (14,8%). A maior migração de espermatozoides após Swim Up foi obtida no grupo Controle (11.416.667 espermatozoides/mL), que foi superior ao grupo Trealose (9.250.000 espermatozoides/mL), sendo ambos superiores ao grupo Trealose+PSE (7.250.000 espermatozoides/mL). No segundo experimento, as taxas de prenhez foram semelhantes com a utilização do protocolo curto (70,3%) versus protocolo longo (75%). Em contraste com os dados obtidos anteriormente, a adição de 50 mM de trealose ao meio de congelamento não alterou a viabilidade do sêmen ovino congelado. O tratamento 50 mM de trealose + PSE, reduziu a motilidade no tempo zero e com 3 h de TTR, em relação ao controle, bem como reduziu significativamente o vigor espermático durante o TTR. O grupo Trealose+PSE proporcionou ainda um maior percentual de espermatozoides normais. Os dados obtidos demonstram a necessidade de uma maior concentração de trealose para manifestar os efeitos de criotolerância. No estudo anterior foi utilizado 100 mM de trealose, não sendo ajustado a osmolaridade, sugerindo ser esta uma possível causa da menor viabilidade observada. Todavia, o aumento dos danos de membrana espermática, bem como na redução da migração espermática após Swim Up, no tratamento Trealose+PSE sugerem a necessidade de novas avaliações e ajustes no protocolo. A idêntica taxa de prenhez observada com a utilização de protocolo curto ou longo, demonstra que é possível reduzir o tempo de tratamento, sem alterar o desempenho reprodutivo. O emprego de protocolo curto pode reduzir a incidência de vaginites e até mesmo possibilitar o emprego de pessários sem adição de antibióticos, o que poderia ser benéfico para ovelhas leiteiras.