

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM VEADO-
CATINGUEIRO (*MAZAMA GOUAZOUBIRA*) COM OU SEM
USO DE OCITOCINA CERVICAL**

Gabriella Saloni Duarte
Médica veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM VEADO-
CATINGUEIRO (*MAZAMA GOUAZOUBIRA*) COM OU SEM
USO DE PROTOCOLO FARMACOLÓGICO DE DILATAÇÃO
CERVICAL**

Gabriella Saloni Duarte

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

**Coorientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti
Duarte**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária.**

D812i Duarte, Gabriella Saloni
Inseminação artificial transcervical em veado-catingueiro
(Mazama Goazoubira) : com ou sem uso de protocolo
farmacológico de dilatação / Gabriella Saloni Duarte. --
Jaboticabal, 2022 50 p. : il., tabs., fotos, 5 v.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Maria Emilia Franco Oliveira
Coorientadora: José Maurício Barbanti Duarte

1. TR Artificial insemination. 2. TG Biotecnologia. 3. TR
Animais raros. 4. TR Captive wild animals. 5. TG Animais
silvestres. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

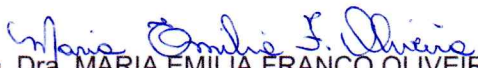
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM VEADO-CATINGUEIRO
(*Mazana gouazoubira*) COM OU SEM USO DE PROTOCOLO
FARMACOLÓGICO DE DILATAÇÃO CERVICAL

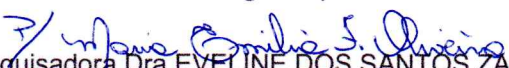
AUTORA: GABRIELLA SALONI DUARTE

ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

COORDENADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal


Pesquisadora Dra EVELINE DOS SANTOS ZANETTI (Participação Virtual)
Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal / Promissão, SP


Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de janeiro de 2022

Jaboticabal, 19 de novembro de 2021

Gabriella Saloni Duarte, nascida em São José dos campos – São Paulo, aos vinte e nove dias do mês novembro do ano de mil novecentos e noventa e três. Foi aprovada na seleção de mestrado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Jaboticabal, para início do curso em julho de dois mil e dezenove. Durante o período apresentou trabalhos em congressos. Ao final gerou o trabalho intitulado “Inseminação artificial transcervical em veado-catingueiro (mazama gouazoubira) com ou sem o uso de protocolo farmacológico de dilatação” sob orientação da Dr^a. Maria Emilia Franco Oliveira e coorientação do Dr. José Maurício Barbanti Duarte.

AGRADECIMENTOS

Deus e a Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos recebidas até aqui e por me dar a força necessária para continuar caminhando!

A minha avó Cledis Rodrigues Pupin, por sempre me motivar, por acreditar no meu potencial, pelo amor e pelo apoio incondicional.

Aos meus pais Ligia Saloni Duarte e Virgílio Garcia Duarte e aos meus avós Neusa Quiroz Saloni, Paulo Saloni e Daycir Carneiro pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, amigos e familiares, por compreenderem a minha ausência e pelo apoio nos momentos de alegrias e tristeza.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Maria Emilia Franco Oliveira por me proporcionar a oportunidade de realizar o mestrado, pelo papel fundamental neste trabalho e na minha formação. Obrigada pela dedicação, por acreditar em mim, pela oportunidade de trabalharmos juntas e por sempre me incentivar a ser uma profissional cada dia melhor. Muito obrigada por toda contribuição.

Ao meu coorientador Dr. José Maurício Barbanti, por cada ensinamento, por ter acreditado em mim, me apoiado, por ter me proporcionado essa experiência única e pela oportunidade de fazer parte do NUPECCE e por cada incentivo.

Gratidão por tudo.

Ao Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca pelo papel fundamental neste trabalho. Obrigada pela dedicação e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Aos pesquisadores e funcionários do NUPECCE, Embrapa Caprinos e Ovinos de Juiz de Fora, pela ajuda, apoio, dedicação e colaboração para que pudesse desenvolver o estudo.

Aos colegas de mestrado David Javier Galindo e Maria Helena Mazzoni Baldini por toda a colaboração no desenvolvimento deste estudo, vocês foram essenciais. Muito obrigada!

Aos Professores e servidores técnicos do NUPECCE e do Departamento de Reprodução animal pela contribuição e atenção. Especialmente ao Sr. Edson e o Hugo.

As amigas pós-graduandas Maria Amélia Ferrão Pupin, Cláudia Ribbas e Isabel Lima, por toda convivência prazerosa e divertida. Obrigada pela bela amizade construída neste tempo, vocês tornaram a jornada mais tranquila e alegre!

As meus grandes amigos Jéssica Ribeiro, Gabriela Betina Barros, Carol Mareques, Lívia Helena Pierozzi, Gabriel Berci, Gabriella Honda, Angélica Manzzone e Joana Meyer não só pelo convívio, mas por toda ajuda cumplicidade

e principalmente pelas horas de conversa, obrigada por tudo!
A UNESP por tudo que me proporcionaram.

A Capes pela bolsa de estudo concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de
Financiamento 001.

A todos que de alguma forma estiveram envolvidos neste projeto, auxiliando e
tornando possível a concretização deste trabalho!

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
 CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	 1
1. Introdução	8
2. Revisão de Literatura	10
2.1 Conseqüência	10
2.2 Biotécnicas da Reprodução	11
2.3 Inseminação artificial em ovinos.....	12
2.4 Inseminação artificial em cervídeos	14
2.5 Protocolo de manipulação do estro.....	15
Referências	15
 CAPÍTULO 2 – Inseminação artificial transcervical em veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>) com ou sem uso de protocolo farmacológico de dilatação cervical	
.....	20
1. Introdução	21
2. Material e Métodos.....	23
2.1 Condição experimental	23
2.2 Controle do ciclo estral e protocolo de dilatação.....	24
2.3 Inseminação artificial transcervical.....	24
2.4 Diagnóstico de gestação.....	27
2.5 Análise de dados.....	27
3. Resultados	27
4. Discussão.....	28
5. Conclusão	33
Referências	33

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "O efeito da ocitocina na dilatação de cérvix para inseminação artificial transcervical em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)", protocolo nº 015312/19, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria Emilia Franco Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de dezembro de 2019.

Vigência do Projeto	01/02/2020 a 30/08/2021
Espécie / Linhagem	<i>Mazama gouazoubira</i> – Veado catingueiro
Nº de animais	4
Peso / Idade	55-65 Kg; 3-6 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Nupecce-Núcleo de pesquisa e conservação de cervídeos

Jaboticabal, 18 de dezembro de 2019

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcv.unesp.br

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM VEADO-CATINGUEIRO (*MAZAMA GOUAZOUBIRA*) COM OU SEM USO DE PROTOCOLO FARMACOLÓGICO DE DILATAÇÃO CERVICAL

RESUMO

O presente estudo foi delineado para testar a eficiência de técnicas de inseminação artificial transcervical, com imobilização cervical (IATC – IC) ou tracionamento cervical (IATC – TC), associadas ou não ao uso de ocitocina (OT), como protocolo de dilatação cervical, em *M. gouazoubira*. O estudo foi realizado em delineamento *crossover* utilizando quatro fêmeas adultas, em duas réplicas com intervalo de 60 dias. Após a sincronização do estro com acetato de melengestrol (MGA) associado a benzoato de estradiol e cloprostenol sódico, as técnicas de IATC foram realizadas entre 18 – 24 horas da detecção de estro. Após contenção química, as fêmeas receberam i.v. 50 UI de OT (G-OT, $n = 4$) ou 1 mL de solução salina (G-Controle, $n = 4$). Vinte minutos após as inseminações foram realizadas utilizando sêmen congelado/descongelado de um único macho e partida. Comportamento de estro foi observado em 100% (8/8) das fêmeas nas duas réplicas $44,0 \pm 22,0$ horas após a aplicação do cloprostenol. O comprimento médio de vagina foi de $13,0 \pm 1,2$ cm. Sucesso de transposição cervical com deposição de sêmen no corpo do útero foi alcançado em 50% (4/8) dos procedimentos. Além da taxa de concepção de 50% (4/5) das fêmeas, os tempos de transposição cervical (< 1 min) e dos procedimentos de IATC (~ 17 min) podem ser considerados satisfatórios. Em resumo, os índices de desempenho das técnicas de IATC – IC e IATC – TC demonstram sucesso na aplicação em fêmeas *M. gouazoubira*, independentemente do uso de OT como protocolo de dilatação cervical.

Palavras-chave: IA, imobilização cervical, tracionamento cervical, ocitocina, cervídeo neotropical.

Scientific Report da Nature

TRANSCERVICAL ARTIFICIAL INSEMINATION IN THE BROWN BROCKET DEER (*MAZAMA GOUAZOUBIRA*) WITH OR WITHOUT THE USE OF A CERVICAL DILATION PROTOCOL

ABSTRACT The present study aimed to test the efficiency of transcervical artificial insemination techniques, with cervical immobilization (TCAI-CI) or cervical traction (TCAI-CT), associated or not with the use of oxytocin (OT), as a protocol for cervical dilation in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). The study was carried out in a crossover design using four adult females, in two replicates with an interval of 60 days. After estrus synchronization protocol using melengestrol acetate (MGA) (D0-D6) associated with estradiol benzoate and cloprostenol (D0), and prostaglandin (D6), TCAI techniques were performed during 18 to 24 hours after estrus behavior detection. All females received either an i.v. application of 50 IU of OT (G-OT, $n = 4$) or 1 mL of saline solution (G-Control, $n = 4$) at 20 minutes before the TCAI procedure. The TCAIs were performed using frozen-thawed semen from the same batch. Behavioral estrus was observed in 100% (8/8) of females, within the two replicates, with a mean time of onset of 44.0 ± 22.0 hours after cloprostenol application. The average length of the vagina was 13.0 ± 1.2 cm. It was achieved a 50% (4/8) success of cervical transposition with semen deposition in the uterine body. Regarding inseminations, most of them (87.5%, 7/8) were performed using the TCAI-CT technique and the overall conception rate was 50% (4/8). Cervical transposition times (< 1 minutes) and TCAI procedures (~ 17 minutes) could be considered satisfactory. Thus, the TCAI-CI and TCAI-CT techniques' performance were successful when applied in *M. gouazoubira* females, regardless of the use of OT as a cervical dilation protocol.

Keywords: Cervical immobilization, cervical traction, oxytocin, Neotropical deer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da eficiência das técnicas de inseminação artificial transcervical (IATC)¹, por imobilização cervical ou tracionamento cervical, em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira* submetidas ou não a protocolo de dilatação cervical com ocitocina (G-Controle, 1 mL de solução salina e G-OXT, 50 UI de ocitocina, ambas administradas 20 minutos antes dos procedimentos de inseminação artificial).....**43**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da metodologia experimental empregada para testar a eficiência das técnicas de inseminação artificial transcervical, com imobilização ou tracionamento cervical, em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira* submetidas ou não a protocolo de dilatação cervical com ocitocina. MGA, acetato de melengestrol; IATC, inseminação artificial transcervical.....**39**

Figura 2. Instrumentais, espéculo (A) e aplicador de sêmen (Bi) com o mandril expensor (Bii) e o mandril injetor do sêmen (Biii), desenvolvidos para fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira*, Pinça EMBRAPA (C), Pinça Pozzi (D).....**40**

Figura 3. Imagens sequenciais das etapas dos procedimentos de inseminação artificial realizados em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira*. Instrumentais cirúrgicos (2); espéculo vaginal com foco de luz (B); etapa de introdução do espéculo vaginal (C); etapa de visualização do óstio cervical (D); etapa de colocação de gaze com lidocaína no fundo de saco vaginal (E); etapa da IATC – IC com a pinça EMBRAPA fixada (F); etapa da IATC – TC com as pinças Pozzis fixadas (G); etapa de injeção do sêmen (H); e imagem ultrassonográfica da vesícula embrionária (seta) no útero (I).....**41**

Figura 4. Percentuais de fêmeas inseminadas pela via transcervical e de concepção de acordo com o local de deposição do sêmen em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira* submetidas ou não a protocolo de dilatação cervical com ocitocina (G-Controle, 1 mL de solução salina e G-OT, 50 UI de ocitocina, ambas administradas 20 minutos antes dos procedimentos de inseminação artificial).....**42**

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A exploração do meio ambiente vem acarretando a redução da biodiversidade de forma que a taxa de extinção tem se tornado maior que a especiação (PRIMACK; RODRIGUES, 2002). As biotecnologias da reprodução já se tornaram parte das estratégias para a conservação (FOOSE; WIESE, 2006) e os bancos de germoplasma se posicionam como uma importante estratégia para a conservação *ex situ* de material genético, possibilitando a preservação da diversidade genética de animais selvagens (HIEMSTRA; LENDE; WOELDERS, 2006).

Dentre as biotécnicas da reprodução, a inseminação artificial (IA) é amplamente realizada em cervídeos por via laparoscópica, embora a IA com deposição de sêmen na vagina sem transposição cervical também seja relatada (ZANETTI et al. 2009). A IA laparoscópica (IAL) é relatada em várias espécies de cervídeos, dentre elas: *Mazama americana* (ZANETTI et al. 2009), *Mazama gouazoubira* (PERONI 2013), *Dama dama* (ASHER et al. 1988), *Cervus eldi thamin* (LOCATELLY et al. 2012), *Cervus Nippon* (LOCATELLY 2006), *Cervus elaphus* (CARREGHER 1997), *Elaphurus davidianus* (ARGO 1994), *Odocoileus virginianus* (MAC LEAN 2006) e *Rangifer tarandus* (MORROW et al. 2009). Apesar da viabilidade da técnica de IAL ser satisfatória, como reportado na espécie *M. gouazoubira* taxa de concepção de 50% com uso de sêmen congelado/descongelado (PERONI, 2013), o procedimento é cirúrgico, invasivo e pode causar sequelas reprodutivas, como aderências (ALLER et al. 2009). A IA transcervical (IATC) é a opção menos invasiva e, portanto, mais indicada pelo aspecto de bem-estar animal, entretanto, seu maior obstáculo em cervídeos é a anatomia cervical, que semelhantemente à ovinos, tem o canal cervical tortuoso e com dimensões reduzidas (DUARTE E GARCIA 1995; ZANETTI et al. 2009). Em cervídeos neotropicais, o único relato bem-sucedido de transposição do canal cervical e deposição de sêmen no lúmen uterino foi feito em fêmea *Mazama nemorivaga*, dando origem

a um filhote saudável (OLIVEIRA et al., 2016). Apesar do sucesso, não há outros relatos de emprego da IATC em cervídeos neotropicais.

Em ovinos, o canal cervical é considerado o principal obstáculo para o emprego de técnicas IATC (KERSHAW et al., 2005). Protocolos hormonais visando facilitar a transposição cervical em ovinos têm sido estudados, tendo como base o uso de prostaglandinas E2 e E3 (GUSMÃO et al., 2009; CANDAPPA E BARTLEWSKI, 2011) e a combinação de ocitocina (OT) e estradiol (WULSTER RADCLIFFE, et al., 1999; MASOUDI et al., 2017) antes da realização do procedimento de IATC. Em paralelo, o desenvolvimento de instrumentais e técnicas específicas para ovinos e caprinos também tem auxiliado na obtenção de maior eficiência de procedimentos realizados pela via transcervical. Em caprinos, a técnica de imobilização cervical em que utiliza a pinça EMBRAPA tem se mostrado eficaz para garantir alta taxa de transposição cervical durante os procedimentos de IATC (95%, FONSECA et al., 2017) e para colheita de embriões por via transcervical (100%, FONSECA et al., 2017). Por outro lado, devido a maior tortuosidade do canal cervical ovino em relação ao caprino, altas taxas de transposição cervical (80 – 100%) em procedimento de colheita de embriões por via transcervical têm sido obtidas durante a técnica de pinçamento/tracionamento cervical por meio de pinças Pozzi, antecedido pelo protocolo de dilatação cervical composto pela combinação de benzoato de estradiol, d-cloprostenol e OT (FONSECA et al., 2019; Oliveira et al., 2020). Sucesso equivalente de transposição cervical na colheita de embriões transcervical foi alcançado com a redução da dose (1,0 vs. 0,5 mg) ou eliminação do uso do benzoato de estradiol em ovelhas com estro sincronizado, mantendo a associação com d-cloprostenol e OT (DIAS et al., 2020).

Uma das espécies mais abundantes, tanto na natureza quanto no cativeiro, dentre os cervídeos neotropicais é *Mazama gouazoubira*, que tem ampla distribuição na América do Sul e é classificada com risco de extinção “Pouco Preocupante” pela IUCN. Por isso, tem sido considerada um bom modelo experimental para os cervídeos. Diante do exposto, o presente estudo visou testar a eficiência de duas técnicas de IATC, com imobilização cervical

ou tracionamento cervical, associado ou não ao uso de OT, como protocolo de dilatação cervical, em fêmeas *M. gouazoubira*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação

A exacerbada exploração do meio ambiente vem acarretando a redução da biodiversidade de forma que a taxa de extinção tem se tornando maior que a especiação. A extinção é um processo lento e natural, porém a mesma deve manter um equilíbrio entre número de especiações, mutações e modificações das frequências dos alelos que darão origem a novas espécies. Contudo, nos últimos anos a perda de espécies vem crescendo de tal forma, que muitas vezes pode se tornar irreversível (PRIMACK; RODRIGUES, 2002).

Com a grande perda de habitat, estas populações vêm se mantendo em áreas reduzidas e/ou fragmentadas, afetando sua viabilidade em vida livre. A fragmentação leva ao isolamento das populações, redução de trocas gênicas, levando ao aumento da endogamia e maior risco de extinção (DUARTE, 2005).

Além disso, com o crescimento antrópico as populações isoladas sofrem com a redução de seu habitat e com o acasalamento de animais semelhantes geneticamente, aumentando assim a frequência de homozigose, e a depressão endogâmica, elevando também a frequência de doenças hereditárias e malformações congênitas e reduzindo a fertilidade (ROLDAM et al., 1998).

Os cervídeos são pertencentes ao grupo de ruminantes, tendo mais de 60 espécies no mundo, (WILSON & REEDER, 2005; PUTMAN, 1988). Destas espécies, oito são encontradas no Brasil sendo elas: *Odocoileus virginianus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Blastocerus dichotomus*, *Mazama nemorivaga*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. americana* e *M. bororo* (DUARTE, 1996, DUARTE & MERINO, 1997, ROSSI, 2000, DUARTE & JORGE, 2003).

Das espécies brasileiras, as que se encontram ameaçadas são: Status de conservação vulnerável pela IUCN- *Mazama bororo*, *Mazama nana*, *Blastoceros dichotomus*, status de conservação próximo a ameaça- *Ozotoceros bezoarticus*. Além disso a grande maioria das espécies vem apresentando um declínio populacional (IUCN, 2009).

Nos últimos anos vem aumentando o número de estudos reprodutivos em cervídeos neotropicais (ZANETTI; POLEGATO; DUARTE, 2010; COSTA et al., 2011; FAVORETTO; ZANETTI; DUARTE, 2012; ROLA; ZANETTI; DUARTE, 2013; CURSINO et al., 2014; ZANETTI et al., 2014), porém estes estudos ainda se concentram em espécies como o veado-mateiro (*Mazama americana*) e veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), principalmente devido ao número de animais mantidos em cativeiro e a dificuldade de manejo. Isso faz com que tais espécies possam servir como modelo experimental para estudos reprodutivos, que poderão ser aplicados futuramente em espécies com algum grau de ameaça e que não permitem um manejo tão intenso (DUARTE, 2010).

2.2 Biotécnicas de Reprodução

Nos dias atuais, as biotecnologias da reprodução tornam-se cada vez mais úteis para a conservação da fauna. A reprodução de espécies em cativeiro por meio de reprodução assistida pode auxiliar o aumento populacional e o encaminhamento para programas de reintrodução ou acréscimo de espécies ao meio ambiente (FOOSE; WIESE, 2006). As tecnologias de reprodução assistida possibilitam o intercâmbio de material genético entre populações de cativeiro e vida livre, evitando assim a depressão endogâmica, e a perda de material genético nas pequenas populações (ANDRABI & MAXWELL, 2007), além de reduzir os riscos de translocação de animais para fins reprodutivos, permitindo ainda a união de casais que apresentem incompatibilidade sexual (WILDT, 1989).

Nas últimas décadas uma estratégia eficaz que vem sendo usada são os bancos de germoplasma, que auxiliam na conservação *ex situ* de material genético (WILSON, 2005; HIEMSTRA et al., 2006), sendo um instrumento de grande auxílio para a preservação de

diversidade genética de populações selvagens. A criopreservação de germoplasma é uma alternativa que reduz as limitações impostas pelo tempo e pela distância para a conservação de diversas espécies silvestres em risco de extinção (LOSKUTOFF, 1998), reduzindo assim a necessidade de remover os indivíduos geneticamente importantes da natureza, (WILDT e WEMMER, 1999), assim como a necessidade de transporte de animais adultos entre instituições (DUARTE e GARCIA, 1997).

Já a criopreservação de germoplasma é feita com o uso de botijões de nitrogênio líquido a -196°C , temperatura que mantém as características do material biológico após o descongelamento (SANTOS, 2000). Estes bancos, devem ser constituídos por material genético com boa variabilidade genética e, para que as populações onde este germoplasma for introduzido não sofram limitações genéticas (TROUNSON, 1998).

A associação dos bancos genômicos às técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) (COMIZZOLI et al., 2000) vem se tornando ferramentas fundamentais para os programas de conservação *in situ* e *ex situ* (HOLT E PICKARD, 1999).

Para que o uso destas biotecnologias da reprodução torne-se viável para as espécies selvagens como os cervídeos, se faz necessário um vasto estudo sobre aspectos reprodutivos e protocolos hormonais para controle de ciclo estral (COMIZZOLI et al., 2000; WILDT et al., 1995).

1.1 Inseminação Artificial

A IA tem um grande potencial para ser utilizada em animais selvagens (WILDT et al., 1997; WILDT, 1989), devido a simplicidade da técnica. No entanto, para que esta seja viável, é necessário que se tenha conhecimento sobre: o ciclo reprodutivo das fêmeas, formas eficazes de identificar e/ou controlar o estro e a ovulação, coletar sêmen com segurança e confiabilidade, determinar o padrão do ejaculado de cada espécie de interesse e formas

eficientes de depositar o sêmen no momento e local ideal na fêmea (WILDT, 1989; ANDRABI & MAXWELL, 2007).

A IA em espécies de cervídeos comerciais vem sendo bastante estudada, porém esta tecnologia não é facilmente transferida para as espécies ameaçadas (ASHER et al., 1999). A técnica de eleição para a IA em cervídeos atualmente é a videolaparoscopia, uma técnica cirúrgica e invasiva, já que a IA transcervical nestes indivíduos é dificultada pela anatomia da cérvix, semelhante à de ovinos, (ASHER et al., 1993) com um grande número de anéis e com pequena abertura, impossibilitando o acesso intrauterino para a deposição do sêmen. Diante dessa problemática, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos para viabilizar a IA transcervical, principalmente em ovinos, por meio do uso de fármacos que promovam a dilatação cervical (SAYRE e LEWIS, 1996).

Em 1993, Asher et al. consideraram a inseminação artificial por vídeo laparoscopia o método preferido para inseminar as espécies *C. elaphus* e *D. dama*. É a técnica de eleição para grande parte das espécies não-domésticas, incluindo os cervídeos de pequeno porte (LEIBO e SONGSASEN, 2002), contudo, a técnica apresenta algumas limitações como a necessidade de anestesia do animal, treinamento na técnica de laparoscopia e custos dos equipamentos (WILLARD et al. 1998).

Em protocolos com monitoramento de estro, as IAs são realizadas 10-18h após o início do estro (BOWERS et al. 2014; JACOBSON et al. 1989; MAGYAR et al., 1989; JABBOUR et al., 1993)

No entanto, é importante salientar que inúmeros fatores contribuem para o sucesso das diferentes técnicas de inseminação empregadas, entre eles a dose e a qualidade do sêmen; o método de sincronização e o tempo decorrente até a inseminação; a experiência dos técnicos e o estresse do manejo (MORROW et al., 2009).

Como a família Cervidae apresenta grandes semelhanças anatômicas, fisiológicas e reprodutivas com bovinos, caprinos e ovinos, as biotecnologias da reprodução aplicadas nestes animais podem facilitar a aplicação destas técnicas em cervídeos, por meio de

algumas adequações (DUARTE e GARCIA, 1997).

A associação de E2 (estradiol)-OT (ocitocina) pode ser considerada eficaz para a promoção de dilatação cervical, possibilitando a TE de modo mais rápido, com equivalente sobrevivência e desenvolvimento embrionário. Este tratamento não provocou efeitos negativos na função lútea, e obteve maior sucesso na transferência de embriões transcervical quando comparada à laparoscópica (RADCLIFFE et al., 1999).

Apesar do remodelamento cervical durante a fase estral, a penetração cervical para a IA em ovelhas continua sendo problemática (CANDAPPA & BARTLEWSKI, 2011; FONSECA et al., 2016). Diversas doses de OT foram testadas para a dilatação de cérvix, a ocitocina exógena induz contração uterina e relaxamento cervical, portanto pode ser uma boa opção para facilitar a passagem da cérvix e chegada ao útero (SAYRE; LEWIS, 1997). Sucesso equivalente de transposição cervical na colheita de embriões transcervical foi alcançado com a redução da dose (1,0 vs. 0,5 mg) ou eliminação do uso do benzoato de estradiol em ovelhas com estro sincronizado, mantendo a associação com d-cloprostenol e OT (DIAS et al., 2020).

A inseminação artificial pode ser efetuada com sêmen fresco, resfriado ou congelado. De uma forma geral, o sêmen fresco tem melhores resultados. A inseminação artificial tem melhores resultados quando realizada pela via laparoscópica. Porém, o custo com equipamento é uma problemática. A inseminação artificial transcervical é realizada com sucesso semelhante à laparoscópica em cabras (RITAR & SALAMON, 1983).

Recentemente, foi desenvolvida a técnica de fixação cervical (FONSECA & BRUSCHI, 2005). A contenção do animal em apoio quadrupedal, introdução do espéculo mais indicado para o animal, fixação da cérvix dorsalmente com o pinçamento do óstio cervical e fixação, com uma pinça Allis (26cm) ou Embrapa e transposição com a pipeta de inseminação com movimentos latero-laterais (para os lados) e crânioventrais (para cima e para baixo) (FONSECA et al. 2011).

Com isso, o índice de transposição cervical, que era da ordem de 65% pelo método tradicional, ultrapassou os 90% (SIQUEIRA, 2006).

Todavia, em ovelhas, a transposição cervical ainda apresenta grandes desafios

superados por meio do desenvolvimento de técnicas alternativas. A via cervical superficial sem tracionamento tem sido referenciada com relativo sucesso (GORDON, 1997).

A tração cervical associada ao uso de novos aplicadores também tem reportado sucesso em ovinos (FONSECA & BRUSCHI, 2005). A técnica de tração cervical consiste em: higienizar a região perineal, escolha do espéculo para o tamanho e anatomia de cada fêmea, introdução do espéculo com lubrificante não espermecida, fixação da cérvix dorsalmente no óstio cervical, aplicação de duas pinças pozzi lateralmente, retirada da pinça embrapa, tração da cervix, latero-lateral e dorso-ventral respeitando as limitações anatômicas de cada fêmea. Após a exposição da cérvix na rima vulvar, fazer a transposição com a pipeta de inseminação após a transposição é feita a deposição do sêmen.

1.2 Protocolo de sincronização de estro em cervídeos

Os protocolos tradicionais de sincronização de estro em cervídeos baseiam-se na utilização de dispositivos internos liberadores de progesterona, no entanto, apesar da eficácia para a sincronização, essa técnica necessita de contenção química e/ou física para a introdução do dispositivo, o que pode levar os animais ao estresse e concomitante alteração da fisiologia reprodutiva (DOBSON E SMITH, 2000; ZANETTI et al., 2014). Com o intuito de minimizar a manipulação física, o uso de progestágenos orais, como o acetato de melengestrol (MGA), pode ser uma alternativa para a sincronização de estro em animais selvagens (referencia).

A sincronização do estro foi baseada no protocolo hormonal descrito por Tanaka et al. (2020) sugerem a eficácia da administração de estradiol (D0), o fornecimento de MGA na dose de 1,0 mg/animal/dia, fracionada em duas doses (manhã e tarde) (D0-D6), e aplicação de prostaglandina no (D6) na manipulação do estro em fêmeas de veado-da-mão-curta (*Mazama nana*) e veado-roxo (*Mazama nemorivaga*).

REFERÊNCIAS

ALLER, J. F. et al. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal reproduction science**, v. 119, n. 1-2, p. 1-8, 2010.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

ASHER, G.W.; MONFORT, S.L.; WEMMER, C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. **Journal Reproduction Fertiity. Suppl.** v.54, p.143-56, 1999.

ASHER, G.W.; FISHER, M.W.; FENNESSY, P.F.; SUTTIE, J.M.; WEBSTER, J.R. Manipulation of reproductive seasonality of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, v.33, p.241–265, 1993.

ARGO, C. MCG et al. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer semen. **Reproduction**, v. 100, n. 2, p. 629-636, 1994.

BOWERS, S.D.; BROWN, C.G.; STRAUCH, T.A.; GANDY, B.S.; NEUENDORFF, D.A.; RANDEL, R.D.; WILLARD, S.T. Artificial insemination following observational versus electronic methods of estrus detection in red deer hinds (*Cervus elephus*). **Theriogenology**, v.62, p.652–663, 2004.

CARRAGHER, JOHN F.; INGRAM, JOHN R.; MATTHEWS, LINDSAY R. Effects of yarding and handling procedures on stress responses of red deer stags (*Cervus elaphus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 51, n. 1-2, p. 143-158, 1997.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition and Development**, v.40, p.493-504, 2000.

CANDAPPA, I. B. R., & BARTLEWSKI, P. M. Review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 3, p. 162–175, 2011.

CURSINO, M. S., SALVIANO, M. B., ABRIL, V. V., DOS SANTOS ZANETTI, E., & DUARTE, J. M. B. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**, 14(1), 1-13, 2014.

DOBSON H, SMITH RF. What is stress, and how does it affect reproduction. **Anim Prod Sci**, v.60-61, p.743-752, 2000.

DUARTE, J.M.B. e GARCIA, J.M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia E Conservação De Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 199, p. 228-238, 1997.

DUARTE, J.M.B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociência**, v.9, n.1-2, p.541-544, 2005.

DUARTE, J.M.B. Guia de Identificação de Cervídeos Brasileiros. **Jaboticabal: FUNEP**, p.14, 1996.

DUARTE, J. M. B. & MERINO, M. L. Taxonomia e Evolução. *In: Biologia e conservação de cervídeos sulamericanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama. Jaboticabal: FUNEP, p.1-21, 1997.*

DUARTE, J. M. B. & JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, v. 45, n. 170, p. 281-287, 1996.

DIAS JH, PUPIN MA, DUARTE GS, BRAIR VL, DE PAULA CJ, DE SOUSA MA, BATISTA RI, SOUZA-FABJAN JM, OLIVEIRA ME, FONSECA JF. Successful transcervical uterine flushing can be performed without or reduced dose of oestradiol benzoate in cervical relaxation protocol in Dorper ewes. **Reproduction in Domestic Animals**. V. 55, p.844-50, 2020.

FAVORETTO, S. M.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Cryopreservation of Red Brocket Deer Semen (*Mazama americana*): Comparison between three extenders. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 43(4):820-827. 2012.

FONSECA, J. F. D., ZAMBRINI, F. N., GUIMARAES, J. D., SILVA, M. R., FRANCO OLIVEIRA, M. E., BRANDAO, F. Z., GONCALVES S.F. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, 118-125, 2019

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

FONSECA, J. F., BRUSCHI, J. H., SANTOS, I. C. C. VIANA, J. H. M. ; PALHÃO, M. P. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 85, n. 1- 2, p. 117-124, 2005a.FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 43, p. 1-13, 2005.

FOOSE, T. J.; WIESE, R. J. Population management of rhinoceros in captivity. **International Zoo Yearbook**, e. 1, v. 40, p. 174-196, 2006.

GUSMÃO, A. L., SILVA, J. C., BITTENCOURT, L. E. P., MARTINS, H. D. G., & BARBOSA, L. P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p.313–318, 2009.

HIEMSTRA, S.J.; LENDE, T.; WOELDEERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. *In: RUANE, J. E SONNINO, A. (Ed.). The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*, FAO: Rome Italy, p.45-59, 2006.

HOLT, W.V. e PICKARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v.4, p.143-150, 1999.

IUCN, 2009. 2009 IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org (downloaded on 12.10.09).

JABBOUR, H.N.; VELDHUIZEN, F.A.; GREEN, G.; ASHER, G.W. Endocrine responses and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.98, p.495–502. 1993

JACOBSON, H. A.; BEARDON, J.; WHITEHOUSE, D.B. Artificial insemination trials with white-tailed deer. **Journal of Wildlife Management**, v.53, p.224-227, 1989.

KERSHAW, Claire M. et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1225-1235, 2005.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 303-326, 2002.

LOCATELLI, Y. e MERMILLOD, P. Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. **INRA Productions Animales**, v.18, n.1, p.3-25, 2005.

LOSKUTOFF, N.M. Biology, Technology and Strategy of Genetic Resource Banking in Conservation Programs for Wildlife. **Gametes: Development and Function**, e. 1, p.275-286, 1998.

MACLEAN, Robert A. et al. Surgical technique for tubal ligation in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 3, p. 354-360, 2006.

MASOUDI, R.; SHAHNEH, A.Z.; TOWHIDI, A.; KOHRAM, H.; AKBARISHARIF, A.; SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; SHAHAB-EL-DEEN, M.; Cervical dilation and improvement of reproductive performance in fat-tailed ewes via cervical dilator treatments. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.6, p. 93-96, 2017.

MAGYAR, S. T.; BIEDIGER, T.; HODGES, C.; KRAEMER, D. C.; SEAGER, W. J. A method of artificial insemination in captive while-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Theriogenology**, v.31, p.1075-1080, 1989.

MORROW, C. J.; PENFOLD, L. M.; WOLFE, B. A. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 149-165, 2009.

OLIVEIRA, MEF, ZANETTI, EDS, CURSINO, MS Primeiros filhotes vivos de *Mazama nemorivaga*, nascido por inseminação artificial. **Eur J Wildl Res** 62, 767-770 (2016)

PERONI, E.F.C.; DUARTE, J.M.B.; ZANETTI, E. S., Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) com sêmen congelado “Dissertação” (Área: Reprodução Animal) - **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** – Unesp Câmpus de Jaboticabal, 2013.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, p. 327, 2002.

PUTMAN, R.J. **The Natural History of Deer**. London; Christopher Helm. p. 191, 1988.

RADCLIFFE, M.C; COSTINE, B. A.; LEWIS, G. S. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer **Janim SCI**, v.77,

p. 2587-2593, 1999.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 36, p. 49-59, 1983.

ROLA, Luciana D.; ZANETTI, Eveline S.; DUARTE, José Maurício B. Avaliação de dois métodos para condicionamento e coleta de sêmen em quatro espécies do gênero *Mazama*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 658-662, 2012.

ROLDAN, E.R.; CASSINELLO, J.; ABAIGAR, T.; GOMENDIO, M. Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate, **Proceedings of the Royal Society of London . Series B. Biological**, v.265, p.243–248, 1998.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [S.l.], v. 12, ed. especial, p. 70-84, 2000.

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

TANAKA Y, AMERICANO AP, GALINDO DJ, DUARTE JM. Low invasive estrous synchronization protocol for wild animals: an example with melengestrol acetate in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Animal Reproduction**. ;e.17(4), 2020

TROUNSON, A. et al. Manipulation of development: opportunities for animal breeding. **Gametes: development and function**, v. I, p. 485-498, 1998.

WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S.; BROWN, J.L.; MONFORT, S.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.811-824, 1995.

WILDT, D.E.; WEMMER, C. Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. **Biodiversity and Conservation**, v.8, p.965-976, 1999.

WILDT, D.E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.20, p.391-395, 1989.

WILLARD, S. T., FLORES-FOXWORTH, G., CHAPMAN, S., DREW, M. L., HUGHES, D. M., NEUENDORFF, D. A., & RANDEL, R. D. Hybridization between wapiti (*Cervus elephus manitobensis*) and sika deer (*Cervus nippon*): a comparison of two artificial insemination techniques. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 295-299, 1998.

WILSON, D. E. & REEDER, D. A. M. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. **Johns Hopkins University Press**, 2005.

WULSTER-RADCLIFFE, Meghan C.; COSTINE, Beth A.; LEWIS, Gregory S. Estradiol-17 β -oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. **Journal of animal science**, v. 77, n. 10, p. 2587-2593, 1999.

ZANETTI ES, DUARTE JMB, POLEGATO BF, GARCIA JM, CANOLA JC. Assisted reproductive technology. In: duarte jmb, gonzalez s. (eds.) Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, **Jaboticabal/Gland**, p.255-270, 2010.

ZANETTI, Eveline dos Santos; DUARTE, José Maurício Barbanti. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo biology**, v. 31, n. 6, p. 642-655, 2012.

ZANETTI, E.S.; MUNERATO, M.S.; DUARTE, J.M.B. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 1-9, 2014.

ZANETTI, E.S.; POLEGATO, B.F.; DUARTE, J. M. B. Primeiro relato de inseminação artificial com tempo-fixado em veado-mateiro (*Mazama americana*). In: **Anais XVIII congresso brasileiro de reprodução animal, Belo Horizonte: CBRA**, 2009.

CAPÍTULO 2 – Inseminação artificial transcervical em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) com ou sem uso de protocolo farmacológico de dilatação cervical

Gabriella Saloni Duarte¹, David Javier Galindo¹, Maria Helena Mazzoni Baldini ¹ Jeferson Ferreira da Fonseca², José Mauricio Barbanti Duarte¹, Maria Emilia Franco Oliveira^{2,3,*}

¹ Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

² Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04, CP 145, Sobral, CE, 62010-970, Brazil.

³ Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

*Autor correspondente: mef.oliveira@unesp.br

RESUMO

O presente estudo foi delineado para testar a eficiência de técnicas de inseminação artificial transcervical, com imobilização cervical (IATC – IC) ou tracionamento cervical (IATC – TC), associadas ou não ao uso de ocitocina (OT), como protocolo de dilatação cervical, em fêmeas *M. gouazoubira*. O estudo foi realizado em delineamento *crossover* utilizando quatro fêmeas adultas, em duas réplicas com intervalo de 60 dias. Após a sincronização do estro com acetato de melengestrol (MGA) associado a benzoato de estradiol e cloprostenol sódico, as técnicas de IATC foram realizadas entre 18 – 24 horas da detecção de estro. Após contenção química, as fêmeas receberam i.v. 50 UI de OT (G-OT, $n = 4$) ou 1 mL de solução salina (G-Controle, $n = 4$). Vinte minutos após as inseminações foram realizadas utilizando sêmen congelado/descongelado de um único macho e partida. Comportamento de estro foi observado em 100% (8/8) das fêmeas nas duas réplicas $44,0 \pm 22,0$ horas após a aplicação

do cloprostenol. O comprimento médio de vagina foi de $13,0 \pm 1,2$ cm. Sucesso de transposição cervical com deposição de sêmen no corpo do útero foi alcançado em 50% (4/8) dos procedimentos. Além da taxa de concepção de 50% (4/5) das fêmeas, os tempos de transposição cervical (< 1 min) e dos procedimentos de IATC (~ 17 min) podem ser considerados satisfatórios. Em resumo, os índices de desempenho das técnicas de IATC – IC e IATC – TC demonstram sucesso na aplicação em fêmeas *M. gouazoubira*, independentemente do uso de OT como protocolo de dilatação cervical.

Palavras-chave: IA, imobilização cervical, tracionamento cervical, ocitocina, cervídeo neotropical.

1. INTRODUÇÃO

A exploração do meio ambiente vem acarretando a redução da biodiversidade de forma que a taxa de extinção tem se tornado maior que a especiação (PRIMACK; RODRIGUES, 2002). As biotecnologias da reprodução já se tornaram parte das estratégias para a conservação (FOOSE; WIESE, 2006) e os bancos de germoplasma se posicionam como uma importante estratégia para a conservação *ex situ* de material genético, possibilitando a preservação da diversidade genética de animais selvagens (HIEMSTRA; LENDE; WOELDERS, 2006).

Dentre as biotécnicas da reprodução, a inseminação artificial (IA) é amplamente realizada em cervídeos por via laparoscópica, embora IA com deposição de sêmen na vagina sem transposição cervical também seja relatada (ZANETTI et al. 2009). A IA laparoscópica (IAL) é relatada em várias espécies de cervídeos, dentre elas: *Mazama americana* (ZANETTI et al. 2009), *Mazama gouazoubira* (PERONI 2013), *Dama dama* (Asher et al. 1990), *Cervus eldi thamin* (LOCATELLI et al. 2006), *Cervus Nippon* (LOCATELLI et al. 2006), *Cervus elaphus* (CARREGHER et al. 1997), *Elaphurus davidianus* (ARGO 1994), *Odocoileus virginianus* (MAC LEAN 2006) e *Rangifer tarandus* (MORROW et al. 2009). Apesar da viabilidade da técnica de IAL ser satisfatória, como reportado na espécie

M. gouazoubira taxa de concepção de 50% com uso de sêmen congelado/descongelado (PERONI, 2013), o procedimento é cirúrgico, invasivo e pode causar sequelas reprodutivas, como aderências (ALLER et al. 2009). A IA transcervical (IATC) é a opção menos invasiva e, portanto, mais indicada pelo aspecto de bem-estar animal, entretanto, seu maior obstáculo em cervídeos é a anatomia cervical, que semelhantemente à ovinos, tem o canal cervical tortuoso e com dimensões reduzidas (DUARTE E GARCIA 1995). Em cervídeos neotropicais, o único relato bem-sucedido de transposição do canal cervical e deposição de sêmen no lúmen uterino foi feito em fêmea *Mazama nemorivaga*, dando origem a um filhote saudável (OLIVEIRA et al., 2016). Apesar do sucesso, não há outros relatos de emprego da IATC em cervídeos neotropicais.

Em ovinos, o canal cervical é considerado o principal obstáculo para o emprego de técnicas IATC (KERSHAW et al., 2005). Protocolos hormonais visando facilitar a transposição cervical em ovinos têm sido estudado, tendo como base o uso de prostaglandinas E2 e E3 (GUSMÃO et al., 2009; CANDAPPA E BARTLEWSKI, 2011) e a combinação de ocitocina (OT) e estradiol (WULSTER RADCLIFFE, et al., 1999; MASOUDI et al., 2012) antes da realização do procedimento de IATC. Em paralelo, o desenvolvimento de instrumentais e técnicas específicas para ovinos e caprinos também tem auxiliado na obtenção de maior eficiência de procedimentos realizados pela via transcervical. Em caprinos, a técnica de imobilização cervical em que utiliza a pinça EMBRAPA tem se mostrado eficaz para garantir alta taxa de transposição cervical durante os procedimentos de IATC (95%, FONSECA et al, 2017) e para colheita de embriões por via transcervical (100%, FONSECA et al, 2017). Por outro lado, devido a maior tortuosidade do canal cervical ovino em relação ao caprino, altas taxas de transposição cervical (80 – 100%) em procedimento de colheita de embriões por via transcervical têm sido obtidas durante a técnica de pinçamento/tracionamento cervical por meio de pinças Pozzi, antecedido pelo protocolo de dilatação cervical composto pela combinação de benzoato de estradiol, d-cloprostenol e OT (FONSECA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; FIGUEIRA et al., 2018; ARRAIS et al.,

2021). Sucesso equivalente de transposição cervical na colheita de embriões transcervical foi alcançado com a redução da dose (1,0 vs. 0,5 mg) ou eliminação do uso do benzoato de estradiol em ovelhas com estro sincronizado, mantendo a associação com d-cloprostenol e OT (DIAS et al., 2020).

Uma das espécies mais abundantes, tanto na natureza quanto no cativeiro, dentre os cervídeos neotropicais é a *Mazama gouazoubira*, que tem ampla distribuição na América do Sul e é classificada com risco de extinção “Pouco Preocupante” pela IUCN. Por isso, tem sido considerada um bom modelo experimental para os cervídeos. Diante do exposto, o presente estudo visou testar a eficiência de duas técnicas de IATC, com imobilização cervical ou tracionamento cervical, associado ou não ao uso de OT, como protocolo de dilatação cervical, em fêmeas *M. gouazoubira*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Condição experimental geral

Para este estudo o protocolo de aprovação do CEUA FCAV (comitê de ética para o uso de animais) foi nº 015312/19. O estudo foi realizado em delineamento *crossover*, com intervalos de 60 dias entre o término da primeira réplica e início da segunda, de modo que todas as fêmeas pertenceram aos dois grupos experimentais. Foram utilizadas quatro fêmeas (2 pluríparas e 2 nulíparas) de veado-catingueiro (*M. gouazoubira*), mantidas em baias individuais de 3x4 metros no período de outubro a fevereiro de 2021. A dieta foi composta por alimentos concentrados utilizados para equinos (Equitech Passeio® - Presence® - Paulínia -São Paulo, Brazil) fornecido diariamente pela manhã, e alimento volumoso: soja perene (*Neonotomia wighti*), rami (*Boehmeria nivia*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), fornecidos de acordo com a sua disponibilidade no campo, em uma quantidade média de 1kg/animal/dia, no final da tarde. Água foi oferecida *ad libitum*.

Controle do ciclo estral e protocolo de dilatação cervical

A sincronização do estro foi baseada no protocolo hormonal descrito por TANAKA et al. (2021). As fêmeas receberam duas doses diárias de 2,28 mg de acetato de melengestrol (MGA Premix®; Pfizer. São Paulo, Brasil) durante o período de 7 dias, considerando Dia 0 o início do protocolo hormonal de sincronização do estro. As doses foram fornecidas juntamente a uma fatia de banana, que é um dos alimentos mais palatáveis para a espécie. No Dia 0, as fêmeas ainda receberam i.m. 0,25 mg (0,25 mL) de benzoato de estradiol (Sincrodiol®; Ourofino Saúde Animal Ltda., Cravinhos, Brasil). Concomitantemente à última aplicação de MGA (Dia 6) foi administrado i.m. 265 µg de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD., São Paulo, Brasil) (Figura 1). Entre os Dias 7 e 10, as fêmeas foram submetidas a detecção de comportamentos de estro a cada quatro horas, com o auxílio de um macho da mesma espécie de libido previamente testado e quando a fêmea apresentava sinais de estro e aceitava o macho era instantaneamente separada para que não houvesse a cópula. Uma das fêmeas, que era mais dócil, foi avaliada por meio de pressão dorsal e avaliação de muco vaginal. A resposta ao estro (% , número de fêmeas em estro/número de fêmeas sincronizadas x 100) e o intervalo para o estro (horas após a administração do cloprostenol sódico) foram calculados.

Inseminação artificial transcervical.

As inseminações artificiais foram realizadas entre 18 – 24 horas após a detecção do início do estro, considerando inseminar no terço final do estro de acordo com a duração do estro na espécie (Peroni, 2013). As fêmeas foram primeiramente submetidas a contenção química pela administração i.m. de 7 mg/kg de cloridato de cetamina 10% (Cetamin®, Syntec, Santana do Parnaíba, Brasil) e 1 mg/kg de cloridato de xilazina 2% intramuscular (Xilazin®, Syntec, Santana do Parnaíba, Brasil). Ato seguinte, as fêmeas receberam por via intravenosa 50 UI de OT (Ocitocina forte UCB®, UCB, Jaboticabal, Brasil) (G-OT, $n = 4$) ou 1 mL de solução salina (G-Controle, $n = 4$); estas administrações precederam 20 minutos do início dos procedimentos de IATC. As administrações destes fármacos foram feitas de modo

duplo cego, de modo que o técnico inseminador não soubesse a que grupo a fêmea pertencia. A dose de ocitocina foi determinada com base na dose utilizada em ovinos por DIAS et al. (2020) de acordo com o metabolismo basal da espécie.

Para a analgesia durante o procedimento foi feita a administração de infusão lenta de 2,5 µg/kg de citrato de fentanila (Fentanest®, Cristália, São Paulo, Brasil). Após o procedimento foi feita aplicação de 0,4 mg/kg de composto dipirona/hioscina (Buscofin Composto®, Agener União, Embu Guaçu, Brasil), para uma melhor analgesia após o procedimento.

As fêmeas foram contidas em mesa de procedimentos em decúbito esternal com os membros pélvicos flexionados, mantendo o posicionamento da pelve com os membros pélvicos flexionados. Foram realizadas tentativas de transposição cervical nos procedimentos de IATC, por meio de imobilização cervical (IATC – IC) e por tracionamento cervical (IATC – TC). Os dois procedimentos foram realizados em sequência em todas as fêmeas e réplicas, ou seja, foram submetidas inicialmente a técnica de IATC – IC e na sequência a técnica de IATC – TC. A deposição do sêmen foi feita quando o corpo do útero foi alcançado pela primeira vez.

As técnicas seguiram o previamente descrito para IATC – IC em cabras (Fonseca et al., 2017) e IATC – TC em ovelhas (Fonseca et al., 2019). Após contenção e antisepsia da região perineal e vulvar foi introduzido um espéculo manufaturado (Figura 2) para a espécie, com 17 cm de comprimento e fonte de luz acoplada, previamente lubrificado com gel lubrificante íntimo não espermicida (K-Y®, Semina, São Paulo, Brasil). O comprimento da vagina (cm) foi determinado com auxílio de marcação no aplicador de sêmen; a apresentação cervical classificada conforme Kershaw et al. (2005); e o muco cervical avaliado quanto a presença, cor, aspecto (cristalino, cristalino/estriado, estriado, estriado/caseoso e caseoso) (FONSECA et al., 2017) e quantidade (1 – pouco, 3 – muito). O grau de projeção da cérvix para dentro do espéculo foi classificado de 1 (pouca) a 3 (boa). Um algodão embebido com 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Cloridrato de lidocaína 2%®, Bravet, Rio de Janeiro,

Brasil) foi mantido no fundo de saco vaginal por 2 minutos.

Na técnica de IATC – IC (Figura 3), uma pinça Embrapa de 25 cm (Pinça Embrapa para imobilização cervical e inseminação artificial em pequenos ruminantes, Brasília, Brasil) foi inserida dentro e sob o orifício cervical ou apenas pinçada ventralmente, conforme a anatomia do óstio cervical de cada animal. Na IATC – TC, uma ou duas pinças Pozzi de 26 cm de comprimento foram fixadas lateralmente ao óstio cervical, conforme o grau de distensão da vaginal pelo espéculo. O tracionamento cervical foi realizado até alcançar o limite de cada animal. O grau de dificuldade de pinçamento e tracionamento foi classificado de 1 (fácil) a 3 (difícil) e o pinçamento repetido sempre que a pinça se soltou ou o posicionamento da cérvix não permitia a realização das etapas seguintes das técnicas, tendo o número de repetições anotado. As variáveis quanto a dificuldade e repetição referentes ao pinçamento foram determinadas para as técnicas de IATC – IC e IATC – TC.

As tentativas de transposição cervical foram realizadas com auxílio de um aplicador de sêmen manufaturado para a espécie (com 17 cm de comprimento e duas opções de mandril, um expansor tipo vela Hegar e outro injetor do sêmen). Durante a IATC – TC, a tentativa de transposição cervical foi realizada com o aplicador contendo o mandril expansor. A distância da cérvix transposta (cm), o número de anéis cervicais transpostos e o grau de tortuosidade do canal cervical (1 – retilíneo a 3 – grande tortuosidade) foram anotados. O grau de dificuldade de transposição cervical (1 - fácil a 3 - impossível alcançar o útero), percentagem de fêmeas em que se teve sucesso na transposição cervical (transposição completa), duração da transposição cervical (em minutos, desde a colocação do aplicador de sêmen no óstio cervical até alcançar o útero ou exceder o tempo de 2 min), duração do procedimento de inseminação artificial (em minutos, desde a colocação do espéculo até depositar o sêmen ou exceder o tempo de transposição) foram determinados para as técnicas de IATC por imobilização cervical e por tracionamento cervical. Foram ainda calculados o percentual de fêmeas inseminadas de acordo com o local de deposição do sêmen (vaginal, cervical superficial, cervical profundo e uterino), percentual de ocorrência de

refluxo de sêmen e taxa de concepção.

A inseminação foi feita com uma palheta de 0,25 mL de sêmen congelado/descongelado do mesmo macho e partida, com concentração total de 50×10^6 espermatozoides/palheta. O sêmen estava diluído em tris-gema-glicerol de acordo com metodologia descrita por FAVORETTO et al. (2012) e apresentava, após a descongelação, motilidade de 40%, vigor 3, integridade de acrossoma 87%, integridade de membrana de 95% e 13% de defeitos totais pós-descongelamento. Após inseminação e retirada dos instrumentais, a fêmea teve a região pélvica elevada por 2 minutos e recebeu massagem no clitóris.

Diagnóstico de gestação.

Entre 30 e 35 dias após as inseminações foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassom (Sonoscape A5v® Domed, Valinhos, São Paulo, Brasil), acoplado a transdutor linear transretal na frequência de 7 MHz e a taxa de concepção calculada. As fêmeas prenhes receberam i.m. 265 µg de cloprostenol sódico para a indução da luteólise e perda embrionária, de modo a permitir a realização da segunda réplica com os mesmos animais. A luteólise foi monitorada pela detecção do estro a cada 12 horas por um mês.

Análise dos dados

Análise descritiva dos dados foi feita e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão e/ou percentual. A análise estatística comparativa tornou-se inaplicável dado o baixo número de indivíduos disponíveis; problemática inerente a pesquisas com animais selvagens.

3. RESULTADOS

Todas as fêmeas nas duas réplicas manifestaram comportamento de estro em média $44,0 \pm 22,0$ horas após o final do protocolo de sincronização de estro (aplicação do

cloprostenol). O comprimento médio de vagina foi de $13,0 \pm 1,2$ cm e 75% (3/4) das fêmeas apresentavam cérvix papilar, enquanto 25% (1/4) bico de pato. Presença de muco translúcido foi observada em 100% (4/4) e 75% (3/4) das fêmeas nos G-Controle e G-OT, respectivamente, tendo aspecto cristalino/estriado em 100% das fêmeas do G-Controle e 50% cristalino e 50% cristalino/estriado das fêmeas do G-OT, e quantidade (1 a 3) média de $1,2 \pm 1,2$.

Os resultados das variáveis de eficiência das técnicas de IATC – IC e IATC – TC de acordo com os grupos G-Controle e G-OT estão apresentadas na Tabela 1. Na Figura 4 estão apresentados os percentuais e os número absolutos de fêmeas inseminadas e que conceberam de acordo com o local de deposição de sêmen.

4. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo de IATC em fêmeas de *M. gouazoubira* e alcançou sucesso de transposição cervical com deposição de sêmen no corpo do útero em 50% (4/8) dos procedimentos e taxa de concepção global de 50% das fêmeas. Os índices de desempenho das técnicas de IATC – IC e IATC – TC demonstram sucesso na aplicação dos procedimentos de inseminação artificial não cirúrgicos em fêmeas *M. gouazoubira*, independentemente do uso de ocitocina como protocolo de dilatação cervical.

O sucesso nas inseminações possivelmente foi alcançado devido a uma série de etapas bem-sucedidas. A primeira delas é a boa eficiência do protocolo de controle do ciclo estral utilizado. Tradicionalmente são utilizados dispositivos intravaginais de liberação de progesterona (CIDR®) na sincronização de estro em várias espécies de cervos de clima temperado (MORROW et al., 1992, 1995; ASHER et al., 1992, 1993; ARGO et al., 1994; HOSACK et al., 1997; HOSACK et al. 1999) e tropical (ZANETTI et al., 2010, 2014; ZANETTI e DUARTE, 2012; CURSINO et al., 2014; GALINDO et al., 2015). Apesar de relativo sucesso (50%) na indução de estro sincronizado, como confirmado em estudos anteriores (ZANETTI e DUARTE, 2010), a maior problemática destes protocolos é a necessidade de contenção das fêmeas para inserção e remoção do dispositivo intravaginal. Os manejos são importantes

fontes de estresse para espécies selvagem, que por serem muito sensíveis a fatores estressantes (DOBSON e SMITH, 2000; MORROW et al., 2009), podem ter com consequência a secreção de progesterona adrenal, potencialmente interferindo em parâmetros reprodutivos (MONFORT et al., 1990). Os progestágenos sintéticos orais, como o acetato de melengestrol (MGA) utilizado no presente estudo, tem apontado ser a melhor opção para a sincronização de estro em espécies de cervos. No presente estudo, 100% das fêmeas *M. gouazoubira* manifestaram estro em aproximadamente 44 horas após o final do protocolo. Sucesso similar (100%) foi previamente relatado para esta espécie de cervídeo por TANAKA et al. (2020). Assim, o protocolo de sincronização de estro baseado em MGA é indicado tanto por sua alta eficiência como por melhorar o bem-estar das fêmeas manejados, reduzindo as fontes estressantes, além de oferecer maior segurança aos animais e aos técnicos. A fonte alternativa de progestágeno tem se mostrado também uma opção satisfatória (100%) na sincronização de estro em fêmeas ruminantes domésticas (PATTERSON et al., 1992; SAFRANSKI et al., 1992; JABBAR et al., 1994; POWELL et al., 1996).

Outra etapa crucial para o sucesso alcançado no presente estudo é referente aos procedimentos envolvidos nas inseminações propriamente ditas. O protocolo anestésico utilizado garantiu adequada supressão da sensibilidade dos animais no transcorrer de todas as etapas das técnicas de IATC realizadas. Em ovinos, os procedimentos transcervicais de inseminação e colheita de embriões são realizados após protocolo de tranquilização e bloqueio epidural (S5-C1) (FIGUEIRA et al., 2020). Para cervídeos, o bloqueio epidural é problemático e estressante para os animais no período pós-procedimento, em que o animal pode recuperar da tranquilização/sedação e ainda não ter o restabelecimento dos movimentos dos membros pélvicos. Assim, as fêmeas do presente estudo receberam, além do protocolo de contenção química tradicionalmente utilizado pelo NUPECCE, a associação de infusão lenta de citrato de fentanila (2,5 µg/kg), a fim de mitigar os sinais de desconforto durante o procedimento, e após o procedimento receberam o composto dipirona/hioscina

(0,4mg/kg), de modo a evitar sensibilidade no pós-procedimento.

As técnicas IATC escolhidas demonstraram satisfatórios resultados em fêmeas *M. gouazoubira*, entretanto, para isto foi necessário o desenvolvimento de instrumentais específicos, como o espéculo e aplicador de sêmen, atendendo as particularidades anatômicas da espécie. Os procedimentos e os instrumentais basearam-se em técnicas previamente desenvolvidas para pequenos ruminantes domésticos, como a IATC – IC para cabras (FONSECA et al., 2017) e IATC – TC para ovelhas (FONSECA et al., 2019). Além do desenvolvimento de um espéculo, com menor diâmetro e maior comprimento, e um aplicador de sêmen mais longo, o uso da pinça EMBRAPA garantiu o sucesso da aplicação das duas técnicas de IATC (IATC – IC e IATC – TC). Na primeira técnica mencionada, a imobilização foi realizada unicamente por esta pinça, enquanto na segunda, a pinça EMBRAPA foi utilizada anteriormente a fixação das pinças Pozzis e na maioria dos procedimentos auxiliaram os movimentos de tracionamento, sendo retirada logo em seguida.

Características anatômicas, como comprimento de vagina e apresentação da extremidade externa da cérvix, não haviam sido previamente descritas na espécie *M. gouazoubira*. O comprimento da vagina determinado no presente estudo para a espécie *M. gouazoubira* foi de ~ 13 cm, superior ao relatado para ovinos (4-7 cm; EVANS E MAXWELL, 1990). A maior profundidade da vagina foi a principal demanda para o desenvolvimento de instrumentais específicos, como espéculo vaginal e pipeta de inseminação. As cérvices observadas eram do tipo papila e bico de pato e aparentemente não limitaram a realização dos procedimentos de pinçamento cervical, seja pela pinça Embrapa como pela pinça Pozzi. A distância da cérvix transposta (~ 5 cm) pode ser um indicador do comprimento do canal cervical das fêmeas de *M. gouazoubira*, entretanto, o número de anéis cervicais contados (~ 2.5) parece ter sido subestimado considerando o alto grau de dificuldade de transposição cervical observado.

O muco cervical foi observado na maioria (87,5%, 7/8) das fêmeas, confirmando que estavam em estro. O aspecto do muco é uma característica fisiológica avaliada para

determinar o momento da ovulação, tendo maior acurácia em caprinos (FONSECA et al., 2017) do que em ovinos (SOUZA-FABJAN et al., 2021). Em ambas as espécies domésticas, o muco observado no presente estudo (cristalino e cristalino/estriado) está relacionado a momentos iniciais de estro, antecedendo em ~ 40 h à ovulação (FONSECA et al., 2017). Não há informação do momento em que as ovulações ocorrerem em resposta ao protocolo de sincronização de estro utilizado, mas todas as inseminações artificiais foram feitas em tempo fixo, 18 a 24 horas após o início do estro. A padronização do aspecto do muco observado pode ser um indicador da sincronia de estro entre as fêmeas *M. Gouazobira* e ainda pode ser um indicativo para se atrasar o momento das inseminações. A determinação do momento mais adequado para realizar as inseminações diante deste protocolo de sincronização de estro ainda precisa ser estudado.

A principal limitação anatômica encontrada para realização dos procedimentos de inseminação artificial nas fêmeas de veado-catingueiro, além do maior comprimento vaginal, foi o baixo grau de distensão vaginal. Além disso, apesar de haver certa projeção da cérvix para o interior do espécúlo, a extremidade externa da cérvix não alcançou a rima vulvar e, portanto, os pinçamentos foram realizados ainda no interior do canal vaginal. Estas características nortearam a necessidade de instrumentais específicos para a espécie e alta habilidade e treinamento do técnico para realização dos procedimentos, uma vez que o reduzido diâmetro do canal vaginal é também um grande limitante. Segundo FONSECA et al. (2011), obter boa projeção cervical para o interior do espécúlo é importante para a realização dos procedimentos transcervicais e pode ser facilitada adequando o tamanho do espécúlo para cada fêmea. Entre as fêmeas de *M. gouazoubira* do presente estudo não houve variação do diâmetro vaginal que indicasse uso de diferentes tamanhos de espécúlos. O conjunto de características anatômicas que restringiram o espaço para manipulação da cérvix foi um evidente desafio para a realização da IATC em fêmeas de veado-catingueiro, demonstrado pela necessidade de repetir os pinçamentos entre 3 e 5 vezes por procedimento.

A tortuosidade do canal cervical das fêmeas de *M. gouazoubira* foi classificado em

nível máximo, indicando alto grau de desalinhamento dos óstios dos anéis cervicais. Em ovinos, a cérvix é descrita como um órgão tubular, estreito, longo e tortuoso (CANDAPPA & BARTLEWSKI, 2012) e diferentes padrões de distribuição topográfica dos óstios dos anéis cervicais podem ser encontrados entre fêmeas (FONSECA et al., 2019), levando a maior ou menor facilidade de transposição cervical. O tracionamento cervical pode levar a um maior alinhamento do canal cervical em relação a técnica que usa apenas a imobilização cervical (FONSECA et al., 2017), o que pode ter levado ao aparente maior percentual de sucesso, visto no presente estudo, para a transposição cervical pela técnica IATC com tracionamento cervical.

O uso de protocolos de dilatação cervical é também indicado para favorecer a transposição cervical em ovinos (FONSECA et al., 2017). No presente estudo, o uso exclusivo de ocitocina antes dos procedimentos sugere melhora no percentual de transposição cervical apenas na técnica de tracionamento cervical. O insucesso de transposição cervical pela técnica de imobilização cervical no G-OT pode não ser unicamente pela falta do efeito do fármaco em dilatar o canal cervical, mas pela falta de alinhamento cervical, dificultando a percepção da dilatação dos óstio dos anéis cervicais.

Os tempos de transposição cervical (< 1 minuto) e dos procedimentos de IATC (< 17 minutos, desde a colocação do espécúlo até a deposição do sêmen) são satisfatórios e estimulantes para difusão do uso das técnicas de IATC realizadas no presente estudo em fêmeas de *M. gouazoubira*, assim como se projeta emprego em outras espécies de cervídeos. Em ovinos, foi registrado 83,5% de deposição de sêmen intrauterina em tempo médio de 32 segundos para a transposição cervical (ALVARES et al., 2021).

A taxa de concepção geral foi de 50% das fêmeas, independentemente de receberem previamente ocitocina. Similares taxas de sucesso de gestação foram previamente reportadas após inseminação artificial por laparoscopia na mesma espécie de cervídeo (50%; PERONI et al., 2013) e para fêmeas de *Odocoileus virginianus* (45%; MELLADO et al., 2013) e *Dama dama* (56%; FENNESSY et al., 1990). A ocitocina aparentemente não interferiu nos

índices de sucesso das técnicas de IATC, com exceção da aparente redução da ocorrência de refluxo de sêmen. A ocorrência de refluxo possivelmente é influenciada pelo local de deposição do sêmen (maior quanto mais superficial for a inseminação) e pode diminuir o número de espermatozoides que alcançam o local de fecundação (AZEVEDO, 1998)

Surpreendentemente, a taxa de concepção foi de 100% (n=8) para as fêmeas em que a deposição seminal foi cervical superficial e de 50% (n=4) para as fêmeas em que o sêmen foi depositado diretamente no corpo do útero. Além do local de deposição seminal, outros fatores estão relacionados ao sucesso da concepção, como sincronia inseminação e ovulação, qualidade oocitária, entre outros. O uso de técnicas minimamente invasivas, como as aplicadas no presente estudo, são amplamente demandadas atualmente, em que a sociedade se preocupa com questões de bem-estar animal. Além da menor invasividade, outras características inerentes as técnicas utilizadas no presente estudo, como baixo custo, reduzida demanda por equipamentos/instrumentais, reduzida possibilidade de complicações durante e após os procedimentos, viabilizam suas aplicações a campo (PETHERICK, 2005). Por fim, além dos satisfatórios resultados relacionados ao sucesso de transposição cervical e deposição de sêmen no corpo do útero, a duração do procedimento e taxa de concepção suportam a indicação das técnicas de IATC – IC e IATC – TC em fêmeas de *M. gouazoubira*, independentemente do uso de ocitocina como promotor de dilatação cervical.

5. CONCLUSÃO

A técnicas de inseminação artificial transcervical por imobilização cervical e por trancionamento cervical são aplicáveis em fêmeas de *M. gouazoubira*, requerendo instrumentais específicos devido ao longo canal vaginal (~ 13 cm). São procedimentos minimamente invasivos, de rápida execução (< 17 minutos) e resultaram em satisfatória (50%) taxa de concepção, apesar de elevada dificuldade de completa transposição cervical. O uso exclusivo de ocitocina como promotor de dilatação cervical parece não ter aumentado os índices de sucesso das técnicas.

REFERENCIAS

ALLER JF, FERNANDEZ O, SANCHEZ E. Fixed-time artificial insemination in red deer (*Cervus elaphus*) in Argentina. **Animal Reproduction Science**. 2009 v.115, p.312-6, 2009.

ALVARES, C. T. G., ROMANO, C. C., BRANDÃO, F. Z., & DA CRUZ, J. F. Técnica de inseminação artificial por tração cervical e função luteal em ovelhas Santa Inês após estro sincronizado com cloprostenol ou progestágeno-eCG. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 45(1), 50-57, 2021.

ARGO CM, JABBOUR HN, GODDARD PJ, WEBB R, LOUDON AS. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer semen. **Reproduction**. v. 100, p.629-36, 1994

ASHER, G. W., ADAM, J. L., JAMES, R. W., & BARNES, D. (1988). Artificial insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*): fixed-time insemination at a synchronized oestrus. **Animal Science**, 47(3), 487-492..

ASHER, G.W.; FISHER, M.W.; FENNESSY, P.F.; SUTTIE, J.M.; WEBSTER, J.R. Manipulation of reproductive seasonality of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). **Animal Reproduction Science**, v.33, p.241–265, 1993.

AZEVEDO, O.I.; SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Influência do refluxo da dose inseminante sobre a fertilidade de cabras moxotó inseminadas artificialmente. In: reunião da sociedade brasileira de zootecnia, **Botucatu. Anais**: SBZ p.129-131, 1998.

CANDAPPA, I. B. R., & BARTLEWSKI, P. M. Review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 3, p. 162–175; 2011.

CARRAGHER JF, INGRAM JR, MATTHEWS LR. Effects of yarding and handling procedures on stress responses of red deer stags (*Cervus elaphus*). **Applied Animal Behaviour Science**. e. 51, p.143-58, 1997.

DUARTE, J.M.B. Guia de Identificação de Cervídeos Brasileiros. **Jaboticabal: FUNEP**, p.14, 1996.

DIAS JH, PUPIN MA, DUARTE GS, BRAIR VL, DE PAULA CJ, DE SOUSA MA, BATISTA RI, SOUZA-FABJAN JM, OLIVEIRA ME, FONSECA JF. Successful transcervical uterine flushing can be performed without or reduced dose of oestradiol benzoate in cervical relaxation protocol in Dorper ewes. **Reproduction in Domestic Animals**. V. 55, p.844-50, 2020.

DOBSON H. Softening and dilation of the uterine cervix. **Oxford Reviews of Reproductive Biology** v.10, p. 491–514, 1988.

EVANS, Martin. Temporal and spatial representativeness of alpine sediment yields: Cascade Mountains, British Columbia. **Earth Surface Processes and Landforms: The Journal of the British Geomorphological Group**, v. 22, n. 3, p. 287-295, 1997.

FAVORETTO, S. M.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Cryopreservation of Red Brocket Deer Semen (*Mazama Americana*): Comparison between three extenders. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 43(4):820-827. 2012. FONSECA, J. F., ALVIM, G. P., LOBO, A. M. B. O., & FACÓ, O. Técnica Embrapa de inseminação artificial transcervical em caprinos por meio de imobilização cervical. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Circular Técnica (INFOTECA-E)**. (2011).

FIGUEIRA, L. M. et al. Superovulation and transcervical embryo recovery in Lacaune ewes raised under tropical conditions. In: **Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Animal Reproduction, v. 15, n. 3, p. 402, Jul./Sept. 2018. Abstract A089. Edição dos Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, August 16th to 18th, 2020.

FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; VIANA, J.H.M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, p.113-117, 2011.

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

FONSECA JF, ZAMBRINI FN, GUIMARÃES JD, SILVA MR, OLIVEIRA ME, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JM. Cervical penetration rates and efficiency of non-surgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. **Animal reproduction science**. v. 203, p.25-32, 2019.

FONSECA, J.F., ALVIM, G.P., SOUZA-FABJAN, J.M.G., OLIVEIRA, M.E.F., BRAIR, V.L., BRANDÃO, F.Z., FACÓ, O., 2017. Reproductive features and use of an anti-inflammatory drug in estrus-induced dairy goats artificially inseminated in a standing position with cervix immobilization. *Reprod. Biol.* 17, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.07.002>.

FONSECA JF, ZAMBRINI FN, GUIMARÃES JD, SILVA MR, OLIVEIRA ME, BARTLEWSKI PM, SOUZA-FABJAN JM. Cervical penetration rates and efficiency of non-surgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. **Animal reproduction science**. e.1, v. 203, p. 25-32, 2019.

FOOSE, T. J.; WIESE, R. J. Population management of rhinoceros in captivity. **International Zoo Yearbook**, e. 1, v. 40, p. 174-196, 2006.

FENNESSY, P.F.; MACKINTOSH, C.G.; SHACKELL, G.H. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Animal Production**, v.51, p.613–621, 1990.

GUSMÃO, A. L., SILVA, J. C., BITTENCOURT, L. E. P., MARTINS, H. D. G., & BARBOSA, L. P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**

Zootecnia, v. 61, p.313–318, 2009.

HIEMSTRA, S.J.; LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: RUANE, J. E SONNINO, A. (Ed.). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**, FAO: Rome Italy, p.45-59, 2006.

HOSACK, D. A. et al. Ovarian activity in captive Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). **Journal of mammalogy**, v. 78, n. 2, p. 669-674, 1997. HOSACK, D. A. et al. Stag exposure advances the LH surge and behavioral estrus in Eld's deer hinds after CIDR device synchronization of estrus. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1333-1342, 1999.

IUCN, 2009. 2009 IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org

JABBAR, G.; UMBERGER, S. H.; LEWIS, G. S. Melengestrol acetate and norgestomet for the induction of synchronized estrus in seasonally anovular ewes. **Journal of animal science**, v. 72, n. 12, p. 3049-3054, 1994.

KERSHAW, BAZ. Theatre Ecology – Environments and Performance Events. **Cambridge: Cambridge University Press**(2007).

LOCATELLI Y, VALLET JC, HUYGHE FP, COGNIE Y, LEGENDRE X, MERMILLOD P. Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: effect of season and culture conditions. **Theriogenology**. e.15,p.13-42, 2006.

Locatelli, Y., Hendriks, A., Vallet, J. C., Baril, G., Duffard, N., Bon, N., ... & Legendre, X. (2012). Assessment LOPU-IVF in Japanese sika deer (*Cervus nippon nippon*) and application to Vietnamese sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*) a related subspecies threatened with extinction. **Theriogenology**, 78(9), 2039-2049.

MASOUDI, R.; KOHRAM, H.; SHAHNE, A.Z. et al. Efeito de estradiol e ocitocina no relaxamento cervical ovina. **Afr. J. Biotechnol.**, v.11, p.2803-2806, 2012.

MELLADO, M.; ORTA, C.G.; LOZANO, E.A.; GARCIA, J.E.; VELIZ, F.G.; SANTIAGO, A. Factors affecting reproductive performance of white-tailed deer subjected to fixed-time artificial insemination or natural mating. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, p.581–586, 2013.

MONFORT, S. L; Asher, G. W., Wildt, D. E., Wood, T. C., Schiewe, M. C., Williamson, L. R., ... & Rall, W. F. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen–thawed spermatozoa. **Reproduction**, v. 99, n. 2, p. 459-465, 1993.

MORROW, C. J. et al. Embryo transfer in fallow deer (*Dama dama*): superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 579-590, 1994.

MORROW CJ, PENFOLD LM, WOLFE BA. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. **Theriogenology**. v.71, p.149-65, 2009.

OLIVEIRA, MEF, ZANETTI, EDS, CURSINO, MS Primeiros filhotes vivos de Mazama nemorivaga, nascido por inseminação artificial. **Eur J Wildl Res** 62, 767-770 (2016)

PETHERICK, J.C. Animal welfare issues associated with extensive livestock production: The northern Australian beef cattle industry. **Applied Animal Behaviour Science**,

Rockhampton, p.211-234, 2005.

PERONI, E.F.C.; DUARTE, J.M.B.; ZANETTI, E. S., Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) com sêmen congelado “Dissertação” (Área: Reprodução Animal) - **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** – Unesp Câmpus de Jaboticabal, 2013.

PATTERSON, D. J. et al. Management considerations in heifer development and puberty. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 4018-4035, 1992.

POWELL, M. R. et al. Use of melengestrol acetate-based treatments to induce and synchronize estrus in seasonally anestrous ewes. **Journal of animal science**, v. 74, n. 10, p. 2292-2302, 1996.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, p. 327, 2002.

SAFRANSKI, T. J.; LAMBERSON, W. R.; KEISLER, D. H. Use of melengestrol acetate and gonadotropins to induce fertile estrus in seasonally anestrous ewes. **Journal of animal science**, v. 70, n. 10, p. 2935-2941, 1992.

SOUZA-FABJAN, Joanna Maria Gonçalves et al. Use of two doses of cloprostenol in different intervals for estrus synchronization in hair sheep under tropical conditions. **Tropical animal health and production**, v. 50, n. 2, p. 427-432, 2018.

TANAKA Y, HERÉDIAS-RIBAS CM, BALDINI MH, GUEVARA JE, DUARTE JM. Evaluation of potential seasonality in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) bucks. **Theriogenology**. May 20. 2021.

TANAKA Y, AMERICANO AP, GALINDO DJ, DUARTE JM. Low invasive estrous synchronization protocol for wild animals: an example with melengestrol acetate in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Animal Reproduction**. ;e.17(4), 2020

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; COSTINE, B.A.; LEWIS, G.S. Estradiol-17B-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2587-2593, 1999

ZANETTI ES, DUARTE JMB, POLEGATO BF, GARCIA JM, CANOLA JC. Assisted reproductive technology. In: duarte jmb, gonzalez s. (eds.) Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, **Jaboticabal/Gland**, p.255-270, 2010.

ZANETTI, Eveline dos Santos; DUARTE, José Maurício Barbanti. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo biology**, v. 31, n. 6, p. 642-655, 2012.

ZANETTI, E. S.; POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Primeiro relato de inseminação artificial com tempo fixo em Veado-mateiro (*Mazama americana*). **Congresso brasileiro de reprodução animal**, 2009, Belo Horizonte. Anais Belo Horizonte, 2009.

ZANETTI, E.S.; MUNERATO, M.S.; DUARTE, J.M.B. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 1-9, 2014.

Lista de Figuras:

Figura 1. Esquema representativo da metodologia experimental empregada para testar a eficiência das técnicas de inseminação artificial transcervical, com imobilização ou tracionamento cervical, em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira* submetidas ou não a protocolo de dilatação cervical com ocitocina. MGA, acetato de melengestrol; IATC, inseminação artificial transcervical.

Figura 2. Instrumentais, espéculo (A) e aplicador de sêmen (Bi) com o mandril expensor (Bii) e o mandril injetor do sêmen (Biii), desenvolvidos para fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira*, Pinça EMBRAPA (C), Pinça Pozzi (D)

Figura 3. Imagens sequenciais das etapas dos procedimentos de inseminação artificial realizados em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira*. Instrumentais cirúrgicos (2); espéculo vaginal com foco de luz (B); etapa de introdução do espéculo vaginal (C); etapa de visualização do óstio cervical (D); etapa de colocação de gaze com lidocaína no fundo de saco vaginal (E); etapa da IATC – IC com a pinça EMBRAPA fixada (F); etapa da IATC – TC com as pinças Pozzis fixadas (G); etapa de injeção do sêmen (H); e imagem ultrassonográfica da vesícula embrionária (seta) no útero (I).

Figura 4. Percentuais de fêmeas inseminadas pela via transcervical e de concepção de acordo com o local de deposição do sêmen em fêmeas de cervídeos *Mazama gouazoubira* submetidas ou não a protocolo de dilatação cervical com ocitocina (G-Controle, 1 mL de solução salina e G-OT, 50 UI de ocitocina, ambas administradas 20 minutos antes dos procedimentos de inseminação artificial).

Fig. 1

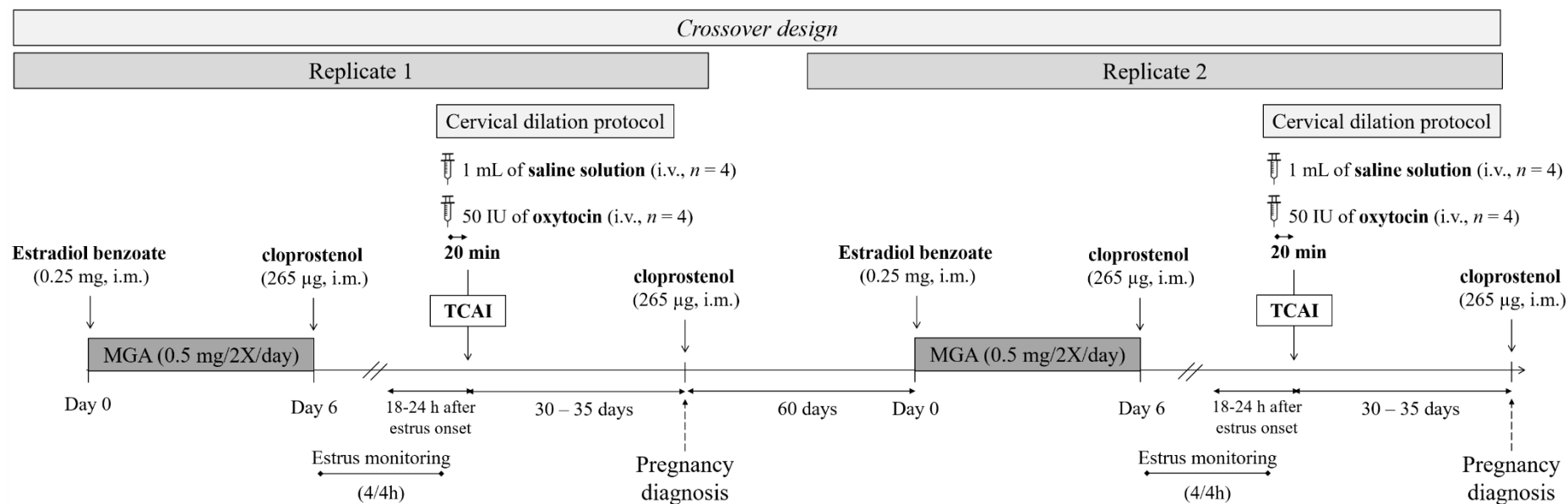


Fig. 2

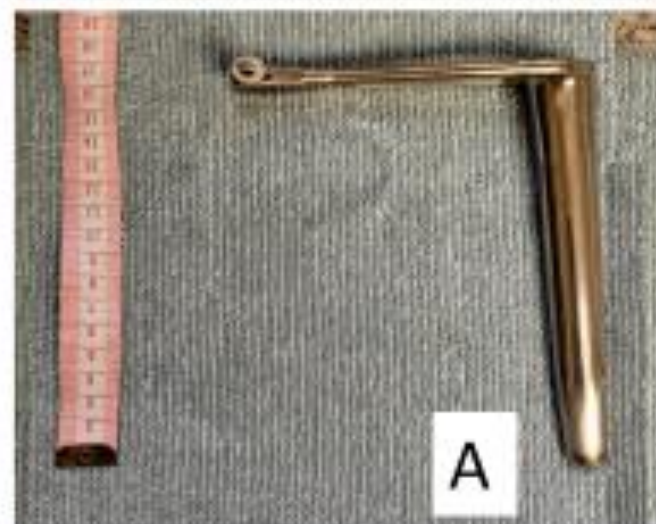
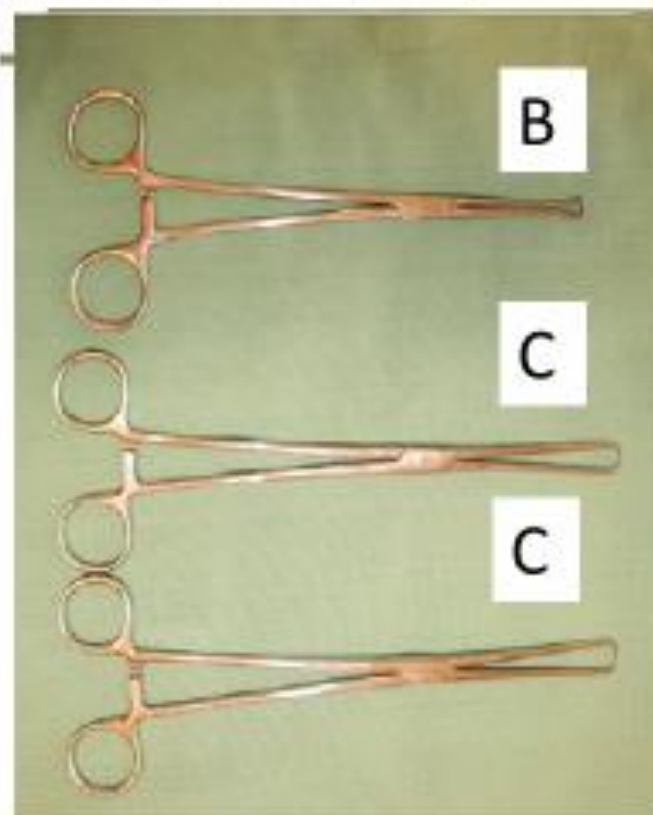


Fig. 3



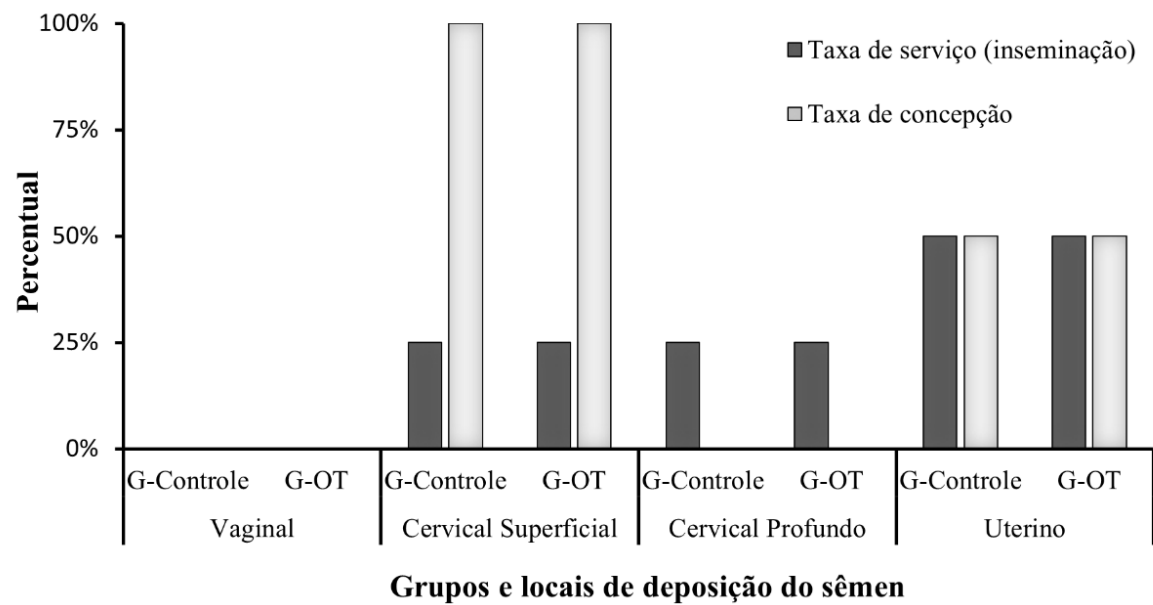
Fig. 4

Tabela 1. Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da eficiência das técnicas de inseminação artificial transcervical (IATC)¹, por imobilização cervical ou tracionamento cervical, em fêmeas de *Mazama gouazoubira* submetidas ou não a protocolo de dilatação cervical com ocitocina (G-Controle, 1 mL de solução salina e G-OT, 50 UI de ocitocina, ambas administradas i.v. 20 minutos antes dos procedimentos de inseminação artificial).

Variáveis	G-Controle	G-OT	Total
Grau de projeção da cérvix no espécuro (1- 3)*	2,0 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,3
Grau de dificuldade de pinçamento na técnica de imobilização cervical (1-3)*	1,5 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,2
Grau de dificuldade de pinçamento na técnica de tracionamento cervical (1-3)*	1,0 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,1
Número de repetições de pinçamento na técnica de imobilização cervical	5,0 $\pm$ 3,6	5,0 $\pm$ 2,4	5,0 $\pm$ 0,0
Número de repetições de pinçamento na técnica de tracionamento cervical	3,3 $\pm$ 2,3	4,0 $\pm$ 1,4	3,6 $\pm$ 0,5
Distância da cérvix transposta (cm)	5,9 $\pm$ 1,7	4,0 $\pm$ 2,6	4,9 $\pm$ 1,3
Número de anéis transpostos	3,5 $\pm$ 1,7	1,5 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 1,4
Grau de tortuosidade do canal cervical (1-3)*	3,0 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,0
Grau de dificuldade da transposição cervical na técnica de imobilização cervical (1-3)*	2,2 $\pm$ 0,9	3,0 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,5
Grau de dificuldade da transposição cervical na técnica de tracionamento cervical (1-3)*	2,2 $\pm$ 0,9	3,0 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,5
% sucesso na transposição cervical na técnica de imobilização cervical	25% (1/4)	0% (0/4)	12,5% (1/8)
% sucesso na transposição cervical na técnica de tracionamento cervical	25% (1/4)	50% (2/4)	37,5% (3/8)
Duração da transposição cervical na técnica de imobilização cervical (min)	0,6 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,3
Duração da transposição cervical na técnica de tracionamento cervical (min)	0,5 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
Duração do procedimento da IATC - imobilização cervical (min)	9,4 $\pm$ 4,0	9,1 $\pm$ 2,5	9,2 $\pm$ 0,2
Duração do procedimento da IATC - tracionamento cervical (min)	17,4 $\pm$ 2,5	16,5 $\pm$ 4,2	16,9 $\pm$ 0,6
% de ocorrência de refluxo de sêmen	50% (2/4)	0% (0/4)	25% (2/8)
Taxa de concepção (%)	50% (2/4)	50% (2/4)	50% (4/8)
% IA com EMBRAPA	25% (1/4)	0% (0/4)	12,5% (1/8)
% IA com Pozzi	75% (3/4)	100% (4/4)	87,5% (7/8)

¹As IATC foram realizadas 18 a 24 horas após o início do estro sincronizado com duas doses diárias de 0,5 mg de acetato de melengestrol (MGA) durante sete dias e administração i.m. de 0,25 mg de benzoato de estradiol e 265 μ g de cloprostenol sódico concomitantemente a primeira e última dose de MGA, respectivamente.

* 1: fácil, 3: difícil; () proporção de animais.