



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICIÊNCIA DO SÊMEN CONGELADO NA RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO
EM OVINOS UTILIZANDO DUAS OU TRÊS INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS**

JÉSSICA DRECHMER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
JULHO DE 2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICIÊNCIA DO SÊMEN CONGELADO NA RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO
EM OVINOS UTILIZANDO DUAS OU TRÊS INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS**

JÉSSICA DRECHMER

ORIENTADOR: ALEXANDRE FLORIANI RAMOS

CO-ORIENTADOR: BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO:

**BRASÍLIA/DF
JULHO DE 2023**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICIÊNCIA DO SÊMEN CONGELADO NA RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO
EM OVINOS UTILIZANDO DUAS OU TRÊS INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS**

JÉSSICA DRECHMER

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, DOUTOR (EMBRAPA)

IVO PIVATO, DOUTOR (UnB)

JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA, DOUTOR (EMBRAPA)

BRASÍLIA/DF, 03 DE JULHO DE 2023

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DRECHMER, J. **Eficiência do sêmen congelado na ressincronização de estro em ovinos utilizando duas ou três inseminações artificiais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, ...p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

DRECHMER, Jéssica. **Eficiência do sêmen congelado na ressincronização de estro em ovinos utilizando duas ou três inseminações artificiais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, ...p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2023.

1. IATF 2. Ultrassonografia Doppler 3. Diagnóstico de gestação precoce 4. Laparoscopia 5. Reprodução animal. I Jéssica Drechmer. II Alexandre Floriani Ramos. III Bianca Damiani Marques Silva.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que já tive na minha vida. A minha família que sempre me apoiou durante toda a minha trajetória acadêmica, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem, por comemorarem cada vitória e nunca me deixarem desistir a cada desafio que encontrei nessa trajetória.

A família do Vladinis, por todo o apoio e incentivo a seguir meu caminho na ovinocultura. Em homenagem ao Vladinis *in memoriam* pela oportunidade e acreditar no meu potencial na ovinocultura, e me apresentar esse mundo maravilhoso da reprodução, será sempre lembrado com muito carinho e sempre dedicarei cada etapa em sua homenagem.

Aos meus orientadores Dra. Bianca e Dr. Alexandre pelas oportunidades, por acreditarem no meu potencial, me ensinarem cada dia mais sobre o mundo da reprodução e da Medicina Veterinária, por toda a paciência em me ensinar e me aturar todos os dias.

Aos meus colegas que estiveram durante minha jornada do mestrado na Fazenda Sucupira. A todos os funcionários pela ajuda e dedicação com os animais, por todo o apoio e ajuda no dia a dia. Muito obrigada.

INDICE

Capítulos/ sub-capítulos	
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SÍMBOLO E ABREVIACÕES	XIII
CAPÍTULO 1 Revisão de literatura	1
1.INTRODUÇÃO	2
2.OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivo específico	4
2.3 Hipótese	4
3.REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1.A raça Santa Inês	5
3.2 Ciclo estral em ovinos	6
3.3 Protocolos de indução e sincronização de estro	7
3.4 Inseminação artificial	8
3.5 Sêmen congelado	9
3.6 Diagnóstico de gestação	11
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 2. Eficiência do sêmen congelado na ressincronização de estro em ovinos utilizando duas ou três inseminações artificiais.	18
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1.INTRODUÇÃO	23
2.MATERIAIS E MÉTODOS	25
Local do experimento e animais experimentais	25
Protocolos de ressincronização de estro (Grupos experimentais)	25
Coleta e congelamento do sêmen	28
Inseminação artificial por laparoscopia	29
Diagnóstico de gestação	29
Análise estatística	31
3.RESULTADOS	32
4.DISSCUSSÃO	34
5.CONCLUSÃO	37
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
7.ANEXOS	41

RESUMO

EFICIÊNCIA DO SÊMEN CONGELADO NA RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM OVINOS UTILIZANDO DUAS OU TRÊS INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS

Jéssica Drechmer¹, Bianca Damiani Marques Silva², Alexandre Floriani Ramos²

Universidade de Brasília¹, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia², Brasília - DF

A ressincronização de estro em ovinos é uma biotécnica reprodutiva recente que se mostrou eficiente em melhorar as taxas de prenhez na estação reprodutiva, diminuindo o intervalo entre inseminações. Estudos vêm utilizando a técnica com a inseminação artificial (IA) pelo método cervical superficial com sêmen fresco, entretanto, a IA por laparoscopia com sêmen congelado pode amplificar o emprego da mesma no melhoramento genético. Neste estudo objetivou-se avaliar a eficiência do sêmen congelado na ressincronização de estro com duas ou três sincronizações de estro seguida da inseminação artificial por laparoscopia. Ovelhas Santa Inês (n=183) foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos: Controle (n=36), submetidas a monta natural com dois carneiros durante 60 dias, sendo que 30 dias após a retirada dos carneiros foi realizado o diagnóstico de gestação; e Re-sync (n=72) e Doppler (n=75), que foram sincronizadas para IA por laparoscopia com sêmen congelado, 50 horas após a retirada do dispositivo, caracterizando o D0. No grupo Re-sync foram realizadas duas inseminações artificiais com início do protocolo de ressincronização após 23 dias da primeira IA e o diagnóstico de gestação sendo realizado aos 30 dias após a IA, as fêmeas identificadas como vazias eram inseminadas novamente. No grupo Doppler as ovelhas foram submetidas ao protocolo de ressincronização de estro dez dias após a primeira IA, o diagnóstico de não gestação foi realizado de forma precoce, aos 17 dias, com auxílio da ultrassonografia Doppler. As fêmeas identificadas vazias eram inseminadas novamente, totalizando três inseminações em 42 dias. Todos os diagnósticos precoces de não gestação foram confirmados 30 dias após a IA.

O grupo controle (83,33%) teve maior taxa de gestação ($P < 0,05$) ao final da estação de monta do que os grupos Re-sync (29,16%) e Doppler (21,33%), que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). Os indicadores da técnica de diagnóstico de não-gestação aos 17 dias com auxílio de ultrassonografia Doppler foram: sensibilidade 100%, especificidade 28%, valor preditivo positivo 21,3%, valor preditivo negativo 100% e acurácia 39,8%. A taxa estimada de gestação no diagnóstico precoce, realizado aos 17 dias após a IA, foi semelhante ao realizado aos 30 dias. Os diagnósticos precoces que não foram confirmados com 30 dias podem estar associados a falha da sincronização no protocolo hormonal utilizado, com o horário da inseminação antecedendo a ovulação, afetando a viabilidade do sêmen congelado no momento da fertilização, já que a taxa final de gestação em ambos os grupos de IA foram semelhantes. Pode-se concluir que a ressincronização de estro associada com a inseminação artificial por laparoscopia utilizando sêmen congelado pode ser aplicada em ovinos, entretanto não foi possível alcançar maior taxa de prenhez com duas ou três inseminações dentro de uma estação de monta.

Palavras-chave: IATF, ultrassonografia doppler, diagnóstico de gestação precoce, laparoscopia, reprodução animal.

ABSTRACT

EFFICIENCY OF FROZEN SEMEN IN ESTRUS RESYNCHRONIZATION IN SHEEP USING TWO OR THREE ARTIFICIAL INSEMINATIONS

Jéssica Drechmer¹, Bianca Damiani Marques Silva², Alexandre Floriani Ramos²
Universidade de Brasília¹, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia², Brasília - DF

Estrus resynchronization in sheep is a recent reproductive biotechnique that has proven to be efficient in improving pregnancy rates in a breeding season, reducing the interval between inseminations. Studies have associated the technique with artificial insemination by cervical superficial method with fresh semen. However, artificial insemination by laparoscopy with frozen semen may increase genetic improvement. This study aimed to evaluate the efficiency of frozen semen in estrus resynchronization with two or three estrus synchronization followed by laparoscopic artificial insemination. Santa Ines sheep (n=183) were randomly distributed into three groups: Control (n=36) were placed for natural mating with two rams for 60 days, 30 days after the removal of the rams, the pregnancy diagnosis was performed. The Re-sync (n=72) and Doppler (n=75) groups were synchronized for artificial insemination by laparoscopy with frozen semen, 50 hours after implant removal, characterizing D0. The Re-sync group underwent two artificial insemination, with resynchronization after 23 days of the first AI, and gestational diagnosis 30 days after insemination, the empty females were inseminated once more. In the Doppler group, the ewes were resynchronized ten days after the first AI, and the early no pregnant diagnosis, at 17 days, with the aid of Doppler ultrasonography. Empty females were inseminated once more, totaling three inseminations in 42 days. All females had the early diagnoses confirmed at 30 days after AI. Control group (83.33%) was superior

($P < 0.05$) in final pregnancy rate than Re-sync (29.16%) and Doppler (21.33%), which did not differ ($P > 0.05$). The indicators of the technique for diagnosing non-pregnancy at 17 days with the aid of Doppler ultrasonography were: sensitivity 100%, specificity 28%, positive predictive value 21,3%, negative predictive value 100%, accuracy 39,8%. In the early pregnancy diagnosis, performed at 17 days, there was no difference compared to D30. Early diagnoses, that were not confirmed at 30 days, may be associated with failure on synchronize protocol used, causing the time of insemination to precede ovulation, affecting the viability of semen frozen at the time of fertilization, as both insemination groups were similar in final pregnancy rate. It can be conclude that estrus resynchronization associated with laparoscopic artificial insemination using frozen semen can be applied in sheep, however it was not possible to achieve a higher pregnancy rate with two or three inseminations within a breeding season.

Key words: FTAI, doppler ultrasonography, early pregnancy diagnosis, laparoscopy, animal reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Delineamento experimental, grupos Controle, Re-sync e Doppler-IA. Legenda: EM: estação de monta; IA: inseminação artificial; P4(+): inserido o dispositivo de progesterona; P4(-): retirada do dispositivo de P4; eCG: aplicado 300 UI de gonadotrofina coriônica equina; PGF: aplicado 0,275 mg de cloprostenol sódico; GnRH: aplicado 25 µg acetato de busorelina. DGP: diagnóstico de gestação precoce; DG: diagnóstico de gestação com 30 dias, PP: preditivo de prenhez.....27

Figura 2: Esquema do protocolo de sincronização de estro: D-9 foi inserido o dispositivo de progesterona, no D-2 a retirada do dispositivo e aplicação de 300 UI de eCG e 0,275 mg de prostaglandina, no D8 36 horas após a retirada do dispositivo ocorreu a aplicação de 25 µg de GnRH. O horário da retirada do dispositivo de P4 determinou o momento da aplicação do GnRH que foi de 36 horas e a inseminação artificial 50 horas após a retirada do dispositivo de P4.....28

Figura 3 (A-D): Avaliação da vascularização do corpo lúteo com US Doppler em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado. A: classificando grau 1 (0 a 25% de irrigação), diagnóstico de vazia; B: grau 2 (25 a 50%), C: grau 3 (50 a 75%), e D, grau 4 (75 a 100%), com diagnóstico presuntivo de prenhez.....30

Figura 4 (A,B): Avaliação ultrassonográfica em modo-B, realizado aos 30 dias após a inseminação em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado. A: diagnóstico de prenhez gemelar, as setas demonstram os dois fetos; B: diagnóstico de prenhez simples, demonstrado pela seta.....31

Figura 5. Frequência dos graus de irrigação do corpo lúteo no diagnóstico de gestação precoce com ultrassonografia Doppler aos 17 dias em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxas de prenhez aos 30 dias, determinada com ultrassonografia modo-B, após inseminação artificial ou monta natural dos diferentes grupos avaliados em ovelhas Santa Inês submetidas ou não a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado.....32

Tabela 2: Taxa de prenhez com diagnóstico precoce por ultrassonografia Doppler aos 17 dias comparativo com o diagnóstico com ultrassonografia Modo-B aos 30 dias identificando as fêmeas prenhez que tiveram diagnósticos preditivos de prenhez em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado.....33

Tabela 3: Tabela de contigência dos indicadores do diagnóstico precoce aos 17 dias com ultrassom Doppler, determinando os parâmetros da técnica do presente trabalho. Foram utilizados os valores de referência: Verdadeiro positivo(VP=16), falso positivo (FP=59), verdadeiro negativo (VN=23), falsos negativo (FN=0).....41

Tabela 4: Relação das partidas selecionadas de sêmen congelado dos carneiros que foram utilizados para a inseminação artificial nos protocolos de sincronização e ressincronização de estro em ovelhas Santa Inês. As partidas foram selecionadas de acordo com os seguintes valores mínimos: motilidade espermática \geq a 70%, motilidade progressiva \geq 40%, VCL (velocidade curvilínea) dos móveis \geq 167, MIAI/MI (membrana e acrossoma integro nas duas técnicas) \geq 30%.....42

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CIDR-Dispositivo de progesterona sintético

CL- Corpo lúteo

DICO- Dispositivo auricular de progesterona

ECC- Escore de condição corporal

eCG- Gonadotrofina coriônica equina

E- Estrógeno

FecG^E- Polimorfismo Embrapa raça Santa Inês

FSH- Hormônio folículo estimulante

GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofinas

GDF-9- Growth and differentiation factor 9 (fator de crescimento e diferenciação 9)

IA- Inseminação artificial

IATF- Inseminação artificial em tempo fixo

LH- Hormônio luteinizante

P4- Progesterona

PGF- Prostaglandina

PGF 2 α - Prostaglandina F2 α

RESSINC- Ressincronização

ROS- Espécies reativas ao oxigênio

TRIS- Trihidroxiaminometano

US- Ultrassonografia

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino atualmente é formado por 20,5 milhões de cabeças, sendo que o Distrito Federal contribui com 22.289 mil cabeças (IBGE, 2021). É possível observar um aumento no número efetivo de rebanho no Brasil de 2016 a 2020 em cabeças de ovinos, este aumento ocorreu principalmente na região Nordeste, onde seu rebanho corresponde a 68,54% do total do país. O Distrito Federal fica em penúltimo colocado, devido ao seu tamanho geográfico, no ranking efetivo de rebanho por estado, perdendo apenas para o Amapá (Magalhães et al., 2020).

Esse aumento na produção de ovinos no país é devido à procura por carne de borrego precoce, considerada de alto valor nutritivo e pela obtenção de cortes nobres. Apesar do aumento, a produção interna atual ainda não é suficiente para atender o mercado, exigindo a importação de carne ovina principalmente do Uruguai, que não possui a mesma qualidade da carne produzida internamente (EMBRAPA, 2023).

Há a necessidade de se aumentar a produção interna de ovinos no país, e uma das formas é incrementar a eficiência produtiva dentro das propriedades, buscando melhorar os índices zootécnicos e possibilitar aplicações de planejamento produtivo para atender a demanda mensal de borregos de qualidade para o mercado consumidor. O uso de biotécnicas reprodutivas permite otimizar a produção e melhorar os índices reprodutivos, com a facilidade de implementação que a espécie ovina fornece, devido ao tempo de gestação ser de 150 dias (Bicudo et al., 2003).

A ressincronização de estro já é uma realidade em fazendas de bovinos de corte que buscam emprenhar o maior número de fêmeas no início da estação de monta para obter bezerros mais pesados e padronizados em épocas mais favoráveis. Existem diversos protocolos de ressincronização de estro utilizados, sendo que o mais recente é o super precoce com a

inserção do dispositivo de progesterona (P4) aos 14 dias após a IA, uma ferramenta eficiente para diminuir o intervalo entre as inseminações (Junior, 2019).

Em ovinos a ressincronização de estro se mostrou eficiente, com boa taxa de concepção após dois protocolos a base de progesterona, quando comparado à monta natural após sincronização de estro. Os protocolos de ressincronização de estro são eficientes para indução da ovulação de nulíparas e múltíparas, ambas alcançando resultados similares e satisfatórios para inclusão em programas reprodutivos (Cosentino, et al. 2021). Desta forma a ressincronização de estro combinada com a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem como principal vantagem a aceleração do ganho genético, permitindo o uso de machos superiores e em menor quantidade (Miranda et al., 2018).

A utilização do sêmen ovino criopreservado na IATF pode aumentar o uso de reprodutores de alto valor genético. Várias doses de sêmen podem ser obtidas a partir de um ejaculado, com vantagens adicionais como o período indeterminado de conservação, facilidade de transporte, emprego da IA, melhor utilização dos reprodutores e proporcionar acasalamentos dirigidos (Maia, 2015). A ressincronização de estro vem sendo utilizada em programas de IATF para melhorar a taxa de prenhez no menor tempo de serviço, porém os trabalhos têm utilizado sêmen fresco pelo método cervical superficial (Miranda et al., 2018; Cosentino, et al., 2019; Cosentino et al., 2021). Considerando as vantagens do sêmen congelado é necessário avaliar o uso na ressincronização de estro com duas ou três sincronizações de estro seguida da inseminação artificial (IA) por laparoscopia em ovinos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do sêmen congelado na ressincronização de estro com duas ou três sincronizações de estro seguida da inseminação artificial por laparoscopia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de prenhez cumulativa em protocolos de ressincronização de estro utilizando sêmen congelado na inseminação artificial.
- Comparar a ressincronização de estro com duas ou três inseminações artificiais com a monta natural.
- Avaliar a ressincronização de estro com duas ou três inseminações artificiais utilizando ou não a ultrassonografia Doppler no diagnóstico de gestação de ovinos.

2.3 HIPÓTESE

Aumentar a taxa de prenhez utilizando sêmen congelado em protocolos de ressincronização de estro com duas ou três inseminações artificiais.

3. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

3.1 A RAÇA SANTA INÊS

A raça Santa Inês foi desenvolvida na região do nordeste brasileiro, resultado do cruzamento entre animais das raças Morada Nova, Somalis, Bergamácia e outros ovinos sem raça definida. Dentre suas características, destacam-se ser deslanada, com pelos curtos, porte médio, machos pesando em torno de 80 a 120 kg e as fêmeas de 60 a 90 kg (ARCO, 2023). As ovelhas da raça Santa Inês atingem a puberdade entre 7 e 10 meses de idade, com peso médio corporal de 25 a 28 kg, o equivalente a 60-70% do peso adulto, com idade ao primeiro parto em torno de 1,5 ano (Pinheiro, 2004).

A raça Santa Inês tem grande potencial adaptativo em várias regiões do país e boa resistência a parasitas gastrointestinais. Dentre as boas características adaptativas e reprodutivas estão sua habilidade materna, partos múltiplos, boa produção de leite e efeito da sazonalidade diminuído, comparado com as outras espécies. O desempenho da raça é expresso principalmente em condições de manejo e nutrição adequadas. Devido a estas características, a raça é muito utilizada para diversos cruzamentos, principalmente para produção de carne (Sousa et al., 2003).

Foi observado alta frequência de partos múltiplos, principalmente duplos, o que pode estar associado a vários genótipos prolíficos determinado por mutações (Castro et al., 2008). Um alelo do GDF-9, denominado FecGE, foi identificado em ovelhas da raça Santa Inês, a mutação nesse gene está associada ao aumento na taxa de ovulação (82%) e de prolificidade (58%), superiores as observadas em ovelhas que não possuíam a mutação (homozigotas). Diferente dos outros genótipos prolíficos, nos quais os animais heterozigotos apresentam

aumento na prolificidade, na mutação $FecG^E$ são os animais homocigotos mutantes que apresentam prolificidade (Silva et al., 2010).

3.2 CICLO ESTRAL EM OVINOS

Os ovinos são poliétricos estacionais de dias curtos e quanto mais próximo à linha do equador, onde não ocorre muita variação na duração das horas de luz, menor ou escassa é essa interferência da luminosidade nos ovinos (Fonseca, 2005). A duração do ciclo estral é em média de 17 dias (Granados et al., 2006).

O GnRH, hormônio responsável pela regulação do ciclo estral, é produzido no hipotálamo, e estimula a hipófise anterior a produzir e secretar o FSH e o LH (Hafez, 1995). Durante a estação reprodutiva, ocorrem a emergência de 3 a 4 ondas de crescimento folicular por intervalo interovulatório, esse padrão é associado as flutuações nas concentrações de FSH. Durante a fase de anestro estacional ocorrem emergência de ondas foliculares, mas não ocorre a ovulação (Bartlewski et al., 2011).

Os eventos que ocorrem durante o ciclo estral em ovinos são regulados pelo GnRH, que estimula a liberação de FSH, resultando no desenvolvimento das ondas foliculares ovarianas. Os folículos antrais em crescimento produzem estrógeno para manifestação do estro. Estimula também a liberação de LH para determinar quais folículos irão atingir a dominância. A fase de estro, na qual a fêmea começa a aceitar a monta pelo macho, tem duração média de 30 a 32 horas, podendo variar em função de raça e idade. Na fase de metaestro, 12 a 16 horas após a manifestação do estro, ocorre o pico de LH e a ovulação do folículo dominante, com liberação do ovócito para fecundação. O folículo que ovulou sofre o processo de luteinização, formando o CL. A luteogênese envolve a cascata funcional e mudanças fenotípicas da granulosa e da teca, formando as células luteais pequenas e grandes, que irão produzir e secretar progesterona para manutenção da gestação. A fase de diestro corresponde ao período mais longo do ciclo estral, com duração de 12 a 14 dias, sendo demarcada principalmente pela atividade luteal e produção de progesterona. Se ocorrer a fecundação, o CL irá permanecer em atividade para manutenção da gestação durante os primeiros 60 dias em ovelhas. Se não ocorrer a fecundação, ocorre o aumento na produção e secreção de $PGF2\alpha$ no endométrio, que vai agir no CL iniciando a luteólise e reduzindo a produção de progesterona. Conseqüentemente ocorrendo o aumento da secreção de GnRH para iniciar uma nova onda folicular estimulando a liberação de FSH para crescimento de ondas foliculares (Hafez, 1995; Granados et al., 2006; Bartlewski et al., 2011).

3.3 PROTOCOLOS DE INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO

A sincronização de estro em ovinos é uma ferramenta reprodutiva que permite que a maior parte das fêmeas demonstre estro em um período restrito de 24 a 72 horas, facilitando o emprego da IA pela redução do período de controle de estros ou mesmo para utilização da IATF (Fonseca, 2006). Os protocolos de sincronização de estro podem ser utilizados para melhorar o gerenciamento produtivo diminuindo o período da fêmea vazia, induzir o estro durante o anestro estacional, obter nascimento de lotes de cordeiros mais homogêneos e permitir a concentração de partos em épocas desejáveis (Moraes et al., 2008).

O protocolo hormonal tradicionalmente utilizado faz uso de dispositivos intravaginais ou esponjas contendo progesterona ou seus análogos, associado a eCG (gonadotrofina coriônica equina), a qual aumenta a ocorrência de múltiplas ovulações e diminui o intervalo entre o final do protocolo e ovulação. Essa associação é necessária para que ocorra uma eficiente indução e sincronização de estro (Rodrigues et al., 2004).

A utilização de dispositivo de P4 no início do ciclo estral encurta o intervalo de picos de FSH resultando na ocorrência antecipada da segunda onda folicular (Bartleswski et al., 2011). A sincronização de estro, utilizando dispositivo de P4 e eCG, aumenta o diâmetro máximo dos folículos ocorrendo um maior crescimento de folículos médios quando comparado com o crescimento dos folículos do ciclo normal, conseqüentemente produzindo um CL de maior diâmetro e maior produção de progesterona para manutenção da gestação (Uribe-Velásquez et al., 2002).

Para sincronização de estro são utilizados protocolos longos, com manutenção de progestágenos por 12 a 14 dias ou curtos, por 5 a 7 dias. As altas concentrações séricas de progesterona, induzidas pelos dispositivos intravaginais, influenciam a dinâmica folicular e o tempo de ovulação (Vilariño et al., 2010). A utilização de protocolos curtos e longos não demonstram diferença quanto a ocorrência de estro e taxa de prenhez quando comparados entre si, sendo eficientes para sincronização de estro em ovelhas (Castilho et al., 2013). Nos dispositivos de silicone contendo progesterona (CIDR- 55,8% 110/197) pode-se observar que a taxa de prenhez é maior quando comparado com as esponjas de acetato de medroxiprogesterona (MAP- 37,4% 74/198), isso se deve ao fato dos dispositivos de silicone liberarem o hormônio lentamente e nas esponjas a liberação é mais rápida alguns casos não ocorrendo uma eficiente sincronização do estro das ovelhas (Santos-Neto, et al., 2015).

A ressincronização de estro em ovinos foi descrito por Miranda et al. (2018) que obtiveram resultados satisfatórios, indicando boa taxa de concepção após dois protocolos a base de progesterona, quando comparado a monta natural após sincronização de estro. Portanto a ressincronização de estro combinada com a IATF tem como principal vantagem a aceleração do ganho genético, permitindo o uso de menos e melhores machos que a monta natural .

Em caprinos a inserção de um segundo dispositivo de P4, sem o conhecimento do status gestacional, não provocou perdas gestacionais ou luteólise (Cosentino, et al., 2020). Em ovinos, Cosentino et al. (2019), observaram que a inserção de outro dispositivo de P4 aos 12 dias após a IA durante a fase lútea tardia, não afetou a gestação inicial. A ressincronização de estro se mostrou eficiente em induzir a ovulação em fêmeas nulíparas alcançando resultados semelhante às múltiparas na primeira sincronização com taxa de prenhez de 45,2% (19/42) e 46,7% (28/60) respectivamente, demonstrando sua eficiência em programas reprodutivos (Cosentino, et al., 2021).

3.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A IA torna possível a utilização de reprodutores altamente selecionados geneticamente, pela produção de doses suficientes para inseminar milhares de fêmeas. A IA em ovinos traz diversas vantagens com a sua utilização, tais como: melhoramento genético principalmente em pequenas propriedades, facilita o teste de progênie, controle de doenças, acelera a introdução de material genético superior, possibilidade de utilização de machos com problemas locomotores, e a utilização de sêmen congelado (Hafez, 1995).

Três técnicas em ovinos são as mais aplicáveis na IA, sendo elas a cervical superficial, a transcervical, e a laparoscopia, todas com taxa de prenhez variável. Na cervical superficial, a fêmea é posicionada com o posterior levantado, e com o auxílio do espéculo com luz, é realizada a visualização da cérvix, a bainha é posicionada na entrada e o sêmen, fresco ou refrigerado, depositado (Moraes et al., 2007). A técnica transcervical demanda o tracionamento da cérvix com auxílio de duas pinças de Allis, obtendo uma maior visualização da entrada da cérvix para introdução do aplicador e deposição do sêmen, podendo ser utilizado fresco, refrigerado ou congelado (Fonseca et al. 2011). A IA intra-uterina por laparoscopia permite a utilização de sêmen congelado. As ovelhas são mantidas em uma maca em posição de Trendelenburg, para facilitar o acesso aos órgãos reprodutivos. São inseridos dois trocartes,

sendo um para a passagem da ótica e visualização do útero, e outro para guiar a bainha com o sêmen diretamente nos cornos uterinos (Ferra and Sereno, 2006).

Os resultados utilizando os mais diversos protocolos hormonais, técnicas de IA e tecnologia de sêmen são variados. Utilizando sêmen fresco diluído para testar a técnica transcervical em comparação com as técnicas cervical e laparoscopia, Casali et al. (2017) obtiveram os resultados de prenhez na laparoscopia de 50,2% (122/243), cervical 36% (86/239) e transcervical 42,3% (44/104). Santos-Neto et al. (2015) comparando as técnicas de IA, obtiveram diferença, no método cervical 39,8% (109/274) e na laparoscopia 58,3% (172/295). Podendo-se concluir que a técnica de inseminação artificial em ovinos por laparoscopia com sêmen fresco obteve melhores taxas de prenhez, pela deposição do sêmen ser o mais próximo do local da ovulação.

Comparando as técnicas de IA, buscando um método viável para programas de IATF, Cardoso (2008), obteve taxas de prenhez na inseminação artificial cervical com sêmen fresco 58,8% (20/34), inseminação artificial cervical com sêmen congelado 14,7% (5/34) e laparoscopia com sêmen congelado 61,7% (21/34). As técnicas utilizaram fêmeas de diversas categorias, múltíparas ou primíparas, mas não houve diferença significativa entre as categorias e as inseminações.

A condição corporal das fêmeas na IA influencia na taxa de não retorno ao cio, onde os escores de condição corporal (ECC na escala de 1 onde significa muito magra e 5 obesa) 2 e 3 obtiveram as melhores taxas de fêmeas que não retornaram o estro, considerando a possibilidade de prenhez. Fêmeas com ECC 2 obtiveram 55,2% (16/29) de taxa de não retorno ao estro com a inseminação cervical superficial utilizando sêmen fresco e 21,9% (7/32) utilizando sêmen congelado enquanto fêmeas com ECC 3 alcançaram 55,9% (33/57) com sêmen fresco e 28,9% (26/90) congelado (Pinheiro, 2009).

3.5 SÊMEN CONGELADO

O advento da criopreservação de sêmen traz vantagens para a reprodução como: preservação de raças e carneiros geneticamente superiores, utilização em programas de IA, segurança em ter material genético guardado caso aconteça algo com o reprodutor e tempo indeterminado de armazenamento. O primeiro relato de congelamento de sêmen em carneiros

foi por Bernstein and Petropavlovsky (1937) (Citado em: Salamon and Maxwell, 2000), utilizando uma solução de glicerol, mas observou-se um efeito tóxico ao espermatozoide.

Um dos meios mais utilizados para criopreservação em ovinos é o Trihidroxiaminometano (TRIS) com a adição da gema, no qual as lipoproteínas de baixa densidade presentes no plasma da gema têm capacidade crioprotetora, melhorando as características seminais no descongelamento (Santos, et al., 2015). Ao longo dos anos alternativas foram sendo buscadas para melhorar a qualidade do sêmen descongelado, visando reduzir os danos causados pelo processo de congelamento, como o acúmulo de produtos tóxicos causados pelos vários diluentes utilizados, principalmente espécies reativas a oxigênio (ROS) formadas pela peroxidação dos lipídios da membrana do espermatozoide, reduzindo assim a sobrevivência no trato reprodutivo feminino (Salamon and Maxwell, 2000).

Um problema frequente encontrado durante o congelamento de sêmen é a variação individual. Alguns carneiros apresentam sêmen com boa motilidade e vigor a fresco, com boas taxas de prenhez na monta natural, mas quando submetidos ao processo de criopreservação não atingem os padrões mínimos de avaliação do sêmen descongelado (Silva, 2014). A integridade de membrana do espermatozoide é sensível as trocas de temperaturas que ocorrem durante o congelamento, devido à alta quantidade de lipídios presentes na membrana. Durante o resfriamento, há a entrada de água na célula, formando cristais de gelo que rompem essas células, danificando sua membrana (Holt, 2000).

A maturação e capacitação dos espermatozoides ocorre dentro do trato reprodutivo feminino. Durante a monta natural há grande quantidade de espermatozoides no ejaculado e somente uma pequena parte consegue alcançar sua capacitação e fecundar o óvulo. No processo de congelamento e descongelamento ocorrem injúrias ao espermatozoide, estressando a célula que, ao entrar em contato com o trato reprodutivo feminino para maturação, sofre reação no acrossoma, diminuindo sua capacidade fecundante. Desta forma, quanto mais próximo ao local da fecundação for depositado o sêmen congelado, melhor será a taxa de prenhez (Gillan, et al., 1997).

O Colégio Brasileiro de Reprodução estabelece padrões mínimos aceitáveis para sêmen de ovinos fresco: motilidade $\geq 80\%$, vigor ≥ 3 , concentração $1-3 \times 10^9/\text{mL}$ e $\geq 80\%$ de espermatozoides normais para ser utilizado a fresco ou para ser congelado. Em relação ao sêmen congelado pós descongelamento, os padrões são: motilidade $\geq 30\%$, vigor ≥ 3 com dose inseminante podendo variar conforme a IA (CBRA, 2013).

3.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Existem diversos estudos que utilizam imagens ultrassonográficas na investigação de processos reprodutivos relacionados ao ovário, útero e função fetal em ovinos. O uso da ultrassonografia leva a diagnósticos mais acurados no manejo reprodutivo, como o diagnóstico precoce de gestação, comparado a ultrassonografia modo B. A ultrassonografia transretal também é utilizada para exames gestacionais em larga escala na ovinocultura atualmente. Sua segurança foi comprovada no experimento realizado por Wurst et al. (2007), onde ficou definido que era uma técnica de baixo estresse.

Avaliando o acompanhamento gestacional com ultrassonografia modo-B em ovelhas Santa Inês, Moraes et al. (2008), observaram a presença de líquido intra-uterino a partir do 15º dia até o 19º dia, com a vesícula embrionária identificada em média aos $18,6 \pm 1,4$ dias de gestação. A visualização do embrião ocorreu em média aos $22,8 \pm 1,9$ dias, e os batimentos cardíacos com 24 dias. Os primeiros sinais de gestação apareceram no 15º dia após a cobertura, mas podem ser confundidos, sendo recomendável emitir o diagnóstico somente a partir do 24º dia diante da possibilidade da visualização do embrião e dos batimentos cardíacos.

A ultrassonografia Doppler é uma técnica que possibilita avaliar o fluxo sanguíneo de tecidos e órgãos e, indiretamente, estimar sua funcionalidade. O Doppler detecta o movimento do sangue no sistema cardiovascular. O desenvolvimento do corpo lúteo é caracterizado pelo aumento da vascularização e intensa atividade mitótica. Dois a três dias após a ovulação há uma intensificação do processo angiogênico dentro do corpo lúteo (Reynolds et al., 2000), que torna-se uma das estruturas mais vascularizadas do corpo (Gaytan et al., 1999), recebendo a maior taxa de fluxo sanguíneo por tecido de todo o organismo (Wiltbank et al., 1988).

A vascularização do corpo lúteo aporta nutrientes para as células lúteas, indispensáveis para produção de hormônios e reguladores que agem na regulação da progesterona (Ayres and Mingoti 2012). Desta forma, a ultrassonografia Doppler permite avaliar a irrigação do CL e estimar sua funcionalidade e, desta forma, predizer um CL ativo ou em luteólise.

A utilização de US doppler em bovinos tem se mostrado eficiente para diagnóstico de não gestação aos 20-22 dias após a IATF. Permitindo que novas estratégias fossem aplicáveis, como a uma nova inseminação 24 dias após a primeira IATF, resincronizando as vacas 14 dias após a primeira IATF. Os resultados utilizando a

ressincronização de estro super-precoce são consistentes sendo possível a sua utilização em larga escala nos programas reprodutivos, pela sua considerável redução de tempo na estação de monta (Pugliese et al., 2017).

Avaliando o fluxo sanguíneo luteal com a ultrassonografia doppler, Arashiro, et al. (2018) e Santos et al. (2020) demonstraram a possibilidade de utilizar essa técnica para identificar as fêmeas vazias e prenhes aos 17 dias após a cobertura, com acurácia de 87%, tornando possível a identificação das fêmeas vazias e associação de protocolos de ressincronização de estro em ovelhas.

O diagnóstico de gestação precoce aos 17 dias após IA é uma técnica que não traz prejuízos a fêmea, de baixo stress, sendo possível identificar precocemente ovelhas vazias, que podem ser redirecionadas para ressincronização de estro (Cosentino, et al., 2019). Desta forma, é possível a sua utilização em larga escala em ovinos, para melhorar cada vez mais o gerenciamento reprodutivo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCO. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. 2023. Acesso em: <http://www.arcoovinos.com.br/PadraoRacial/Details/11>

ARASHIRO, E.K.N., UNGERFELD, R.; CLARIGET, R.P.; PINTO, P.H.N; BALARO, M.F.A.; BRAGANÇA, G.M.; RIBEIRO, L.S.; FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. **Theriogenology**, 106 p. 247-252, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.029>

AYRES, H.; G.Z. MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p.174-180, 2012.

BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 259–268, 2011.

BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 15, 2003. Porto Seguro – BA. Anais... Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003

CASALI, R.; PINCZAK, A.; CUADRO, F.; GUILLEN-MUÑOZ, J. M.; MEZZALIRA, A.; MENCHACA, A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. **Elsevier**. v. 103, pg 30 – 35, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.021>

CASTILHO, C., et al. Protocolos de indução e sincronização de estro em ovelhas. **Ci. Anim. Bras.** v.14, n.1, p. 91-97. Goiânia, 2013. DOI: 10.5216/cab.v14i1.13378.

CASTRO, E.A.; MARTINS, C.F.; MELO, E.O. Estudo molecular no controle da taxa de ovulação em ovinos da raça Santa Inês. **Univ. Ci. Saúde**, v.6, n.1,p. 1-7. Brasília, 2008.

CARDOSO, E. Aspectos técnicos e econômicos da inseminação artificial utilizando sêmen fresco ou congelado em ovinos da raça Santa Inês. Dissertação de mestrado- Mestrado em Zootecnia, **UESB**. Itapetinga, 2008.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo horizonte, 2013: **CBRA**, 2013.

COSENTINO, I.O.; et al. Hormonal protocols for early resynchronization of ovulation in ewes: The use of progestagens, eCG, and inclusion of early pregnancy diagnosis with color Doppler ultrasound. **Theriogenology**, 133, p. 113-118, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.033>

COSENTINO, I.O.; et al. Early resynchronization protocols for goats: Progestogens can be used prior to an early pregnancy diagnosis without affecting corpus luteum functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, vol.55, p. 1655-1659. 2020. <https://doi.org/10.1111/rda.13830>

COSENTINO, I.O.; et al. Fixed timed artificial insemination and early resynchronization of ovulation in diferente categories of ewes in grazing system: Response of multiparous, nulliparous, and lactating ewes during the breeding season. **Livestock Science** 247, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104461>.

EMBRAPA. Brasil em 50 alimentos: Maurício Antônio Lopes. **Embrapa**, Brasília, DF, 2023. ISBN: 978-65-89957-68-3

FERRA, J.C.; SERENO, J.R.B. Inseminação artificial em ovinos. **Documentos Embrapa cerrados**. Planaltina, DF, 2006.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16. Goiânia, 2005.

FONSECA, J.F. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. **Documentos Embrapa caprinos** 1ª edição online. Sobral, 2006. ISSN: 1676-7659;64

FONSECA, J.F.;ALVIM, G.P.; LOBO, A.M.B.O.; FACÓ,O. Técnica Embrapa de inseminação artificial em caprinos por meio da fixação cervical. **Comunicado técnico online Embrapa** n°43. Sobral, 2011.

GAYTAN, F.; MORALES, C.; GARCIA-PARDO, L.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J.E. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology Reproduction**, v.60, p.914–919, 1999.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, fertility and development**, v.9. Australia, 1997.

GRANADOS,L.B.C; DIAS, A.J.B; SALES,M.P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. **Universidade estadual do norte fluminense Darcy Ribeiro**, 1ª ed. Campos Goytacazes, 2006.

HAFEZ,E.S.E. Reprodução animal. 6ª edição, **Editora Manole LTDA**, 1995.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Animal Reproduction Science** 62, 2000.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>.

JUNIOR, W.A.G. Estudos para avaliar a eficiência do protocolo de ressincronização super precoce. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

MAGALHÃES, K.A.; FILHO, Z.F.H.; MARTINS, E.C. Pesquisa pecuária municipal 2020: rebanhos de caprinos e ovinos. EMBRAPA, CIM- Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos, boletim nº16. Sobral- CE, 2021

MAIA, M.S. Tecnologia de semen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. VI Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, VII Seminário Nordestino de Caprino-Ovinocultura. Recife, 2015

MEDAN,M. ,et al. Early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography as a method of improving reproductive efficiency in goats. **Journal of reproduction and development**, vol. 50, no. 4. 2004.

MIRANDA, V.O., OLIVEIRA, F.C., DIAS, J.H., VARGAS JÚNIOR, S.F., GOULARTE, K.L., SÁ FILHO, M.F., SÁ FILHO, O.G. D., BALDASSARRE, H., VIEIRA, A.D., LUCIA, T., GASPERIN, B.G. Estrus resynchronization in ewes with unknown pregnancy status. **Theriogenology** 106, 103–107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.019>.

MORAES,J.C.F.; SOUZA,C.J.H.; JAUME, C.M. Alternativa para inseminação artificial cervical superficial com sêmen congelado em ovinos. **Comunicado técnico** nº62, Embrapa. Bagé, 2007. ISSN 0100-8919.

MORAES, E.P.B.X, et al. Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**,v.9, n.1, p.148-155. 2008.

PINHEIRO, J.H.T. Parâmetros reprodutivos de ovelhas da raça Santa Inês criadas no sertão do Ceará. **Universidade Estadual do Ceará**. Ceará, 2004.

PINHEIRO, C.B.M. Uso do sêmen ovino congelado em inseminações artificiais cervicais e fatores que afetam a fertilidade dos rebanhos. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Faculdade de veterinária, programa de Pós-graduação em ciências veterinárias. Porto Alegre, 2009.

PUGLIESI, G., et al. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.140-150. Belo Horizonte, 2017.

REYNOLDS, L.; GRAZUL-BILSKA, A.; REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v.12, p.1-9, 2000.

RODRIGUES, L.F.D.S.; ARAUJO, A.A.; NUNES, J.F.; MOURA, A.A.A.; MOREIRA, E.P. Sincronizaçõ de estro em ovelhas deslanadas: efeito de diferentes doses de eCG sobre a taxa de ovulação. **Revista de Ciências Agrárias**, 41, 215-222, 2004.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram sêmen. *Animal Reproduction Science* 62, p. 77-111, 2000. DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00155-x

SANTOS, I.W., et al. Crioprotetor para sêmen de carneiro a base de plasma de gema mantém membrana acrossomal intacta após a descongelação. **Ciência rural**, v.45, n.6, p.1107-1112. Santa Maria, 2015.

SANTOS, L.M. et al. Vascularização luteal e diagnóstico de gestação precoce em ovinos. **Comunicado técnico Embrapa**, n.207. Brasília, 2020. ISSN 0102-0110.

SANTOS-NETO, P.C.; GARCÍA-PINTOS, C.; PINCZAK, A.; MENCHACA, A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep, **Livestock Science**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.005>.

SILVA, B.D.M. Sincronização de estro com prostaglandina F2 α versus progesterona associada à gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ovelhas deslanadas no distrito federal. Tese de mestrado. **Universidade de Brasília**, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Pós-graduação em Ciências Animais. Brasília, 2008.

SILVA, B.D.M., et al. A new polymorphism in the growth and differentiation fator 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal genetics**. 2010. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x.

SILVA, T.A.S.N. Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos. **Universidade de Brasília**. Brasília, 2014.

SOUSA, W.H.; LÔBO, R.N.; MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: estado de arte e perspectivas. **Embrapa**, 2003.

URIBE-VELÁSQUEZ, L.F. et al. Endocrine and ovarian response associated with the first wave follicle dominant in sheep synchronized either CIDR or PFG2 alpha. Melhoramento, genética e reprodução. **Revista Brasileira de Zootecnia** n.31. 2002. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000400018>

VILARIÑO, M; et al. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. **Small Ruminant Research**. Amesterdã, v.91, p.219–224, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.02.014>.

WILTBANK, M.C.; DYSKO, R.C.; GALLAGHER, K.P.; KEYES, P.L. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. **Journal Reproduction Fertility**, v.84, p.513–520, 1988.

WURST, A.K.; DIXON, A.B.; INSSKEEP, E.K. Lack of effect of transrectal ultrasonography with restraint on lambing rate and prolificacy in ewes. **Theriogenology**. 68, 1012-1016, 2007.

CAPÍTULO 2

EFICIÊNCIA DO SÊMEN CONGELADO NA RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM OVINOS UTILIZANDO DUAS OU TRÊS INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS

RESUMO

EFICIÊNCIA DO SÊMEN CONGELADO NA RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM OVINOS UTILIZANDO DUAS OU TRÊS INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS

Jéssica Drechmer¹, Bianca Damiani Marques Silva², Alexandre Floriani Ramos²

Universidade de Brasília¹, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia², Brasília - DF

Neste estudo objetivou-se avaliar a eficiência de duas ou três sincronizações de estro seguida da inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado em ovinos. As ovelhas Santa Inês (n=183) foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos: Controle (n=36) foram colocadas para monta natural com dois carneiros durante 60 dias, 30 dias após a retirada dos carneiros foi realizado o diagnóstico de gestação; Re-sync (n=72) e Doppler (n=75) foram sincronizadas para IA por laparoscopia com sêmen congelado 50 horas após a retirada do dispositivo caracterizando o D0. No grupo Re-sync foram realizadas duas inseminações com início do protocolo de resincronização após 23 dias da primeira IA, o diagnóstico gestacional realizado aos 30 dias após a IA, no qual as fêmeas vazias eram inseminadas novamente. No grupo Doppler as ovelhas foram resincronizadas dez dias após a primeira IA e o diagnóstico de gestação realizado de forma precoce aos 17 dias com auxílio da ultrassonografia Doppler. Após o diagnóstico de gestação as fêmeas vazias eram inseminadas novamente, totalizando três inseminações em 42 dias. Todos os diagnósticos precoces de gestação foram confirmados 30 dias após a IA. O grupo controle (83,33%) teve maior taxa de gestação ($P < 0,05$) ao final da estação de monta. Os grupos Re-sync (29,16%) e Doppler (21,33%), foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). Os indicadores da técnica de diagnóstico de não-gestação aos 17 dias com auxílio de ultrassonografia Doppler foram: sensibilidade 100%, especificidade 28%, valor preditivo positivo 21,3%, valor preditivo negativo 100% e acurácia 39,8%. A taxa estimada de gestação

no diagnóstico precoce, realizado aos 17 dias após a IA, foi semelhante ao realizado aos 30 dias. Os diagnósticos precoces que não foram confirmados com 30 dias podem estar associados a falha da sincronização no protocolo hormonal utilizado, com o horário da inseminação antecedendo a ovulação, afetando a viabilidade do sêmen congelado no momento da fertilização, já que a taxa final de gestação em ambos os grupos de IA foram semelhantes. Pode-se concluir que a ressincronização de estro associada com a inseminação artificial por laparoscopia utilizando sêmen congelado pode ser aplicada em ovinos, entretanto não foi possível alcançar maior taxa de prenhez com duas ou três inseminações dentro de uma estação de monta.

Palavras-chave: IATF, ultrassonografia doppler, diagnóstico de gestação precoce, laparoscopia, reprodução animal.

ABSTRACT

EFFICIENCY OF FROZEN SEMEN IN ESTRUS RESYNCHRONIZATION IN SHEEP USING TWO OR THREE ARTIFICIAL INSEMINATIONS

Jéssica Drechmer¹, Bianca Damiani Marques Silva², Alexandre Floriani Ramos²
Universidade de Brasília¹, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia², Brasília - DF

This study aimed to evaluate the efficiency of frozen semen in estrus resynchronization with two or three estrus synchronization followed by laparoscopic artificial insemination. Santa Ines sheep (n=183) were randomly distributed into three groups: Control (n=36) were placed for natural mating with two rams for 60 days, 30 days after the removal of the rams, the pregnancy diagnosis was performed. The Re-sync (n=72) and Doppler (n=75) groups were synchronized for artificial insemination by laparoscopy with frozen semen, 50 hours after implant removal, characterizing D0. The Re-sync group underwent two artificial insemination, with resynchronization after 23 days of the first AI, and gestational diagnosis 30 days after insemination, the empty females were inseminated once more. In the Doppler group, the ewes were resynchronized ten days after the first AI, and the early no pregnant diagnosis, at 17 days, with the aid of Doppler ultrasonography. Empty females were inseminated once more, totaling three inseminations in 42 days. All females had the early diagnoses confirmed at 30 days after AI. Control group (83.33%) was superior ($P < 0.05$) in final pregnancy rate than Re-sync (29.16%) and Doppler (21.33%), which did not differ ($P > 0.05$). The indicators of the technique for diagnosing non-pregnancy at 17 days with the aid of Doppler ultrasonography were:

sensitivity 100%, specificity 28%, positive predictive value 21,3%, negative predictive value 100%, accuracy 39,8%. In the early pregnancy diagnosis, performed at 17 days, there was no difference compared to D30. Early diagnoses, that were not confirmed at 30 days, may be associated with failure on synchronize protocol used, causing the time of insemination to precede ovulation, affecting the viability of semen frozen at the time of fertilization, as both insemination groups were similar in final pregnancy rate. It can be conclude that estrus resynchronization associated with laparoscopic artificial insemination using frozen semen can be applied in sheep, however it was not possible to achieve a higher pregnancy rate with two or three inseminations within a breeding season.

Key words: FTAI, doppler ultrasonography, early pregnancy diagnosis, laparoscopy, animal reproduction.

1. INTRODUÇÃO

A sincronização de estro em ovinos é uma ferramenta reprodutiva que permite a concentração de partos em épocas desejáveis e facilita o emprego da IA pela redução do período de controle de estros e mesmo para utilização da IATF (Moraes et al., 2008). A melhoria nos protocolos de sincronização de estro é crucial para melhorar os índices reprodutivos, e para o aumento do uso da IA. Portanto, é necessário melhorar os protocolos de indução de estro e sincronização da ovulação, para determinar com precisão o melhor momento para IA, e obter CL mais funcionais, com melhor produção de progesterona para manutenção da gestação (Moreira, 2016).

Nos últimos anos vem se buscando alternativas em termos de protocolos de sincronização de estro para reduzir o período de identificar e sincronizar novamente as fêmeas vazias e permitir que sejam inseridas novamente nos programas reprodutivos. Desta forma, a ressincronização de estro em ovinos busca diminuir o período entre inseminações. Miranda et al. (2018), sem saber a condição gestacional iniciou outro protocolo com dispositivo de P4, realizando duas inseminações artificiais em um intervalo de 14 dias, com ovelhas da raça Texel no sul do país com efeito da sazonalidade e obtiveram 55,4% de prenhez. Outro trabalho também utilizou outro dispositivo de progesterona 12 dias após a IA sem saber a condição gestacional e observou que não afetou a gestação do primeiro serviço (Cosentino et al., 2019).

A utilização do diagnóstico precoce de gestação aos 17 dias é uma possibilidade para identificar precocemente as fêmeas vazias, facilitando a tomada de decisão quanto ao manejo ou mesmo a ressincronização das fêmeas para serem submetidas a mais um serviço (Arashiro et al., 2018).

A associação das duas técnicas, ressincronização de estro e diagnóstico preditivo de gestação com ultrassonografia Doppler aos 17 dias, tem como objetivo principal diminuir o intervalo entre inseminações e também o estresse causado nas fêmeas, sendo implementada em programas reprodutivos para aumentar a eficiência reprodutiva e reduzir os custos da propriedade. Desta forma, a ressincronização de estro abre oportunidades para ser incluído em protocolos hormonais de ressincronização em diferentes categorias de fêmeas, como primíparas e multíparas, alcançando resultados similares entre elas na primeira taxa de serviço (Cosentino et al., 2021).

A ressincronização de estro vem sendo utilizada em ovinos associada a inseminação artificial com sêmen a fresco (Miranda et al., 2018; Cosentino et al., 2019, 2021). Porém o sêmen ovino criopreservado possui vantagens como utilizar carneiros de alto mérito genético e acelerar o ganho genético do rebanho em um intervalo de tempo muito menor, facilidade de transporte do sêmen e o tempo indeterminado de conservação. Sabendo-se das vantagens em utilizar o sêmen congelado esse trabalho objetivou avaliar a eficiência do uso de sêmen congelado em protocolos de ressincronização de estro com duas ou três inseminações artificiais em ovinos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O Experimento foi realizado no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira (SCEFS) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen, situada em Brasília, DF, durante os períodos de janeiro a abril de 2022 e 2023. A fazenda está localizada a 15°47' de latitude sul e 47°55' de longitude oeste, 1080 m de altitude, de clima tropical. Foram utilizadas 183 ovelhas e dois carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 2 e 5 anos, com escore corporal médio de 2,5 (na escala de 1 a 5, onde 1 significa muito magra e 5 obesa). As ovelhas foram previamente avaliadas quanto ao estado clínico geral, sanitário e reprodutivo.

Os animais foram mantidos sob pastagem de Capim-mombaça (*Panicum maximum*), suplementadas com concentrado de 180 g/kg de proteína bruta (100 g/animal, duas vezes ao dia) iniciado 15 dias antes do experimento, e mantido até o término do trabalho. Sal mineral e água *ad libitum*.

PROTÓCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO DE ESTRO (GRUPOS EXPERIMENTAIS)

As fêmeas foram separadas aleatoriamente em 3 grupos experimentais (Figura 1). O grupo controle (n=36) permaneceu em monta natural durante 60 dias com dois carneiros, e o diagnóstico de gestação ocorreu 30 dias após a retirada dos mesmos. Os grupos Re-sync (n=72) e Doppler-IA (n=75) foram sincronizados com o protocolo curto (Figura 2) onde no D-9 foi inserido dispositivo de progesterona (Primer® Tecnopec, 36 g de progesterona), retirados 7 dias após (D-2) e aplicado 300 UI de eCG (Sincro eCG® Ourofino, 6.000UI de gonadotrofina coriônica equina) e 0,275 mg de cloprostenol sódico (Cioton® JA Saúde Animal, 26,3 mg de

cloprostenol sódico) e, 36 horas após a retirada do dispositivo (D-1), aplicado 25 µg de acetato de buserelina (Sincroforte® Ourofino, 0,042 mg de acetato de buserelina). Cinquenta horas após retirada do dispositivo (D0) foi realizada a inseminação artificial com sêmen congelado por laparoscopia, obtido dos mesmos carneiros selecionados para o grupo controle.

Nos animais do grupo Re-sync, foi iniciada uma nova sincronização 23 dias (D23) após a primeira IATF, com colocação do dispositivo de P4. Aos 30 dias (D30) foi realizado o diagnóstico de gestação. Nos animais vazios, o protocolo de sincronização de estro e inseminação artificial foi concluído, enquanto as ovelhas com diagnóstico positivo de prenhez tiveram o dispositivo retirado e não foram reinseminadas. A segunda IATF ocorreu em D32, com realização do diagnóstico de gestação em D62.

Nos animais do grupo Doppler-IA, foi iniciada uma nova sincronização 10 dias (D10) após a primeira IATF. Aos 17 dias (D17) após a primeira IATF foi realizado o diagnóstico precoce de não gestação, e as ovelhas com diagnóstico negativo seguiram com o protocolo de sincronização de estro e a segunda inseminação artificial (D19). Dez dias após a segunda IATF (D29) as ovelhas reinseminadas foram submetidas a um novo protocolo de sincronização de estro e o diagnóstico precoce realizado 17 dias após (D36). As fêmeas vazias finalizavam o protocolo de sincronização de estro para uma nova IA, dessa forma foram realizadas três IA em 42 dias. Todos os animais foram confirmados após 30 dias da IA.

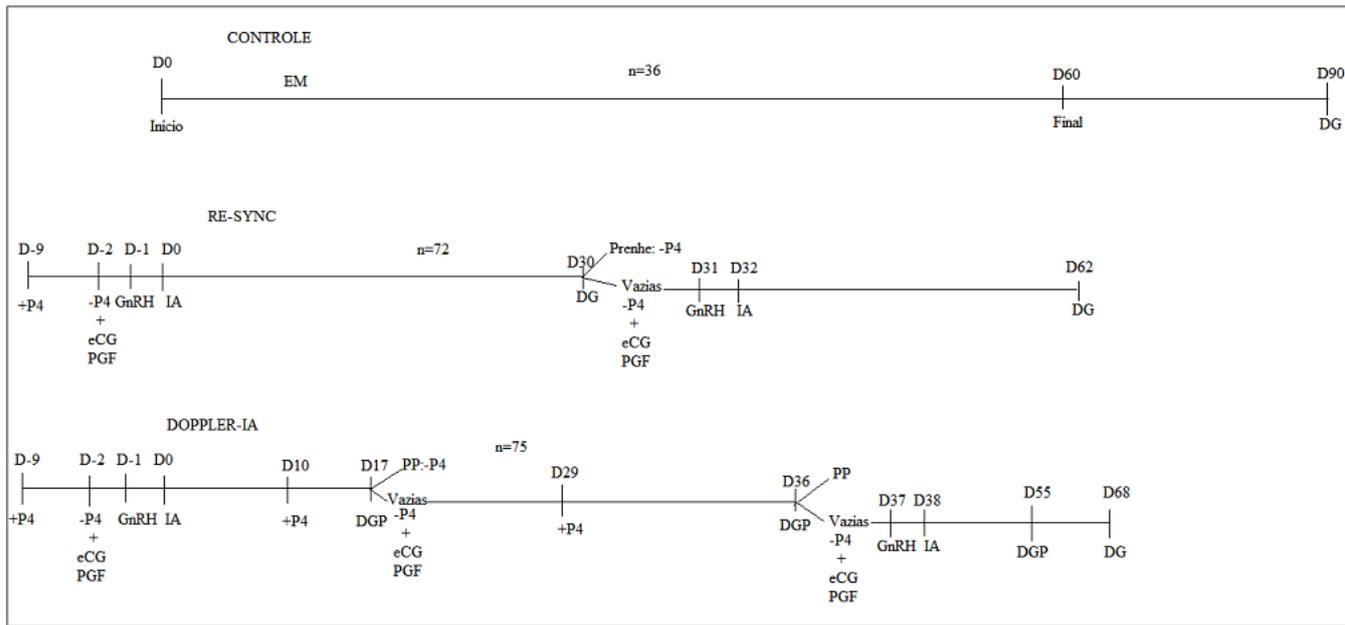


Figura 1: Delineamento experimental, grupos Controle, Re-sync e Doppler-IA. Legenda: EM: estação de monta; IA: inseminação artificial; P4(+): inserido o dispositivo de progesterona; P4(-): retirada do dispositivo de P4; eCG: aplicado 300 UI de gonadotrofina coriônica equina; PGF: aplicado 0,275 mg de cloprostenol sódico; GnRH: aplicado 25 µg acetato de busorelina. DGP: diagnóstico de gestação precoce; DG: diagnóstico de gestação com 30 dias, PP: preditivo de prenhez.

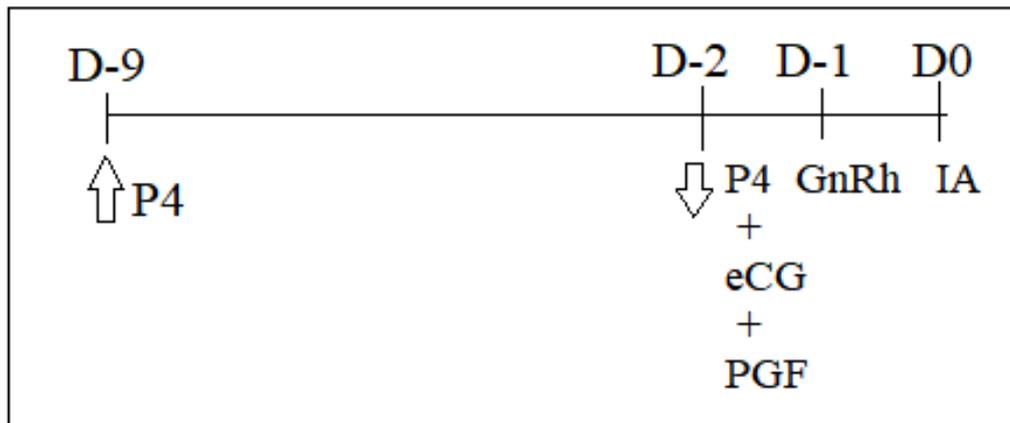


Figura 2: Esquema do protocolo de sincronização de estro: D-9 foi inserido o dispositivo de progesterona, no D-2 a retirada do dispositivo e aplicação de 300 UI de eCG e 0,275 mg de prostaglandina, no D8 36 horas após a retirada do dispositivo ocorreu a aplicação de 25 µg de GnRH. O horário da retirada do dispositivo de P4 determinou o momento da aplicação do GnRH que foi de 36 horas e a inseminação artificial 50 horas após a retirada do dispositivo de P4.

COLETA E CONGELAMENTO DO SÊMEN

Para congelamento de sêmen utilizado nas IATFs foram selecionados dois carneiros após exame clínico geral e andrológico. As coletas de sêmen foram realizadas com auxílio de vagina artificial, e todas as partidas do sêmen foram avaliadas a fresco quanto a motilidade espermática, vigor, patologia e concentração espermática, segundo o Manual de Exame Andrológico (CBRA, 2013). O sêmen foi diluído em meio a base de Tris, ácido cítrico, glicose, gema de ovo e glicerol (Evans e Maxwell, 1990) na concentração de 100×10^6 espermatozoides por palheta de 0,25 ml, acondicionados em cima de um suporte de isopor e levado para a curva de resfriamento em geladeira convencional a $\pm 5^\circ\text{C}$ durante duas horas. Na sequência o sêmen foi exposto a vapor de nitrogênio durante vinte minutos e as palhetas derrubadas para imersão total em nitrogênio líquido para posteriormente serem acondicionadas em raques e armazenadas em botijão de nitrogênio. Após o congelamento/descongelamento, o sêmen foi avaliado em 0 horas e 2 horas, permanecendo em banho-maria a 37°C , pelo CASA (computer assisted semen analyses) e por microscopia de fluorescência para avaliação de integridade da membrana plasmática, utilizando diacetato 6 carboxifluoresceína e iodeto de

propídeo, e integridade do acrossoma utilizando uma conjugação de isotiocianato de fluoresceína com lecitina de amendoim. As partidas foram selecionadas de acordo com os seguintes valores mínimos: motilidade espermática \geq a 70%, motilidade progressiva \geq 40%, VCL (velocidade curvilínea) dos móveis \geq 167, MIAI/MI (membrana e acrossoma integro nas duas técnicas) \geq 30%.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR LAPAROSCOPIA

As inseminações artificiais ocorreram 50 horas após a retirada dos dispositivos de P4. As ovelhas foram previamente preparadas com jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas. Para as inseminações, as ovelhas foram posicionadas em maca em posição de Trendelenburg para facilitar a visualização da cavidade abdominal. Foi realizado tricotomia, antissepsia e anestesia local com cloridrato de lidocaína 2% na área do posicionamento do trocarter para acesso a cavidade abdominal. No lado esquerdo foi inserido a fonte de luz para visualização, e o lado direito para a bainha de IA. Para melhorar a visualização a cavidade abdominal foi inflada com auxílio de nebulizador. O sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos, a dose da palheta era fracionada e dividida em duas bainhas de IA, de forma que cada corno uterino recebesse meia dose inseminante. A bainha de IA foi posicionada perpendicularmente à parede uterina na curvatura maior do útero, onde foi inserida a agulha da IA e depositado o sêmen em cada corno uterino. Após o procedimento os trocartes foram retirados e a cavidade abdominal desinflada, seguida da realização de curativo na região das incisões e liberação das ovelhas para baias com alimento e água.

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação precoce ocorreu aos 17 dias após a IA com auxílio de ultrassom equipado com Doppler colorido (MyLabvet 30 gold, Esaote), utilizando-se probe retal com frequência de 7,5MHz e ganho de 75%. O reto foi lubrificado com mucilagem antes do início das avaliações. Os ovários eram visualizados e o corpo lúteo identificado e avaliado com Doppler, sendo classificado subjetivamente segundo o grau de irrigação. As ovelhas foram consideradas vazia quando apresentaram porcentagem da vascularização do CL classificada com grau 1 (0 a 25% da porcentagem de irrigação do CL), irrigações graus 2 (25 a 50%), 3 (50

a 75%) ou 4 (75 a 100%) foram consideradas preditivo de prenhez (Figura 3). Os graus foram divididos dessa forma para determinar quais porcentagens de irrigações podem prever prenhez aos 17 dias. Em todos os animais sempre foram determinadas as avaliações com dois avaliadores para diminuir o risco de erro de interpretação.

O diagnóstico de gestação aos 30 dias após a IA ou ao final da estação de monta, ocorreu com auxílio de ultrassom modo-B equipado com probe retal, na frequência de 7,5 MHz (Midray, D10 Power), com base na visualização da vesícula embrionária e batimentos cardíacos. Também foi determinado se a gestação era simples ou múltipla (Figura 4).

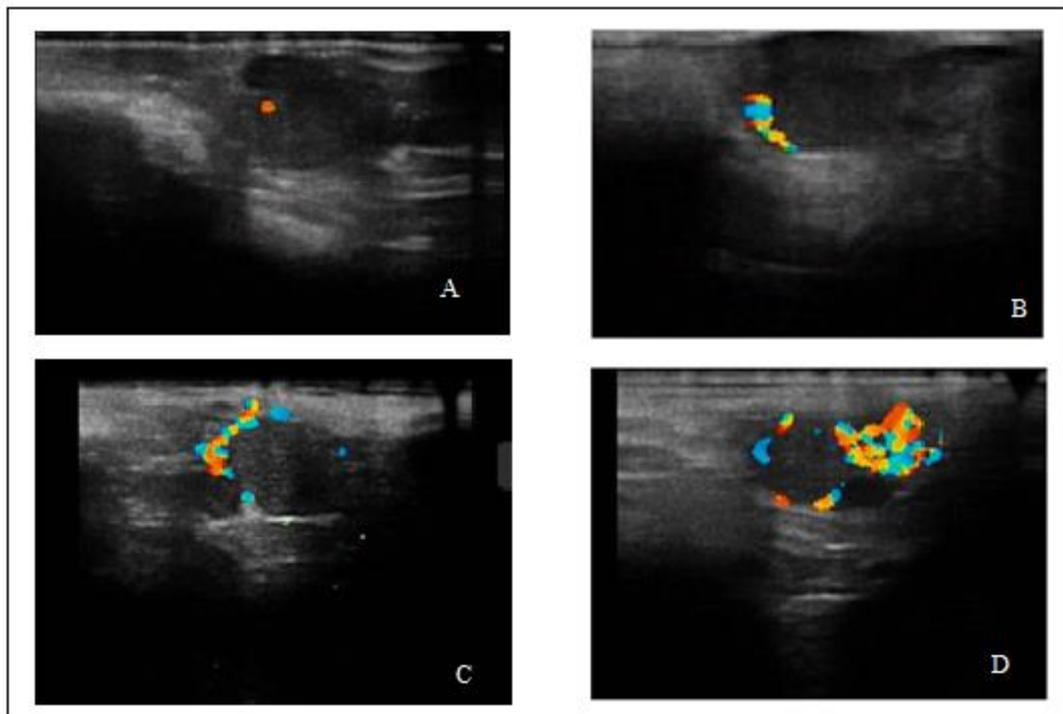


Figura 3 (A-D): Avaliação da vascularização do corpo lúteo com US Doppler em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado. A: classificando grau 1 (0 a 25% de irrigação), diagnóstico de vazia; B: grau 2 (25 a 50%), C: grau 3 (50 a 75%), e D, grau 4 (75 a 100%), com diagnóstico presuntivo de prenhez.

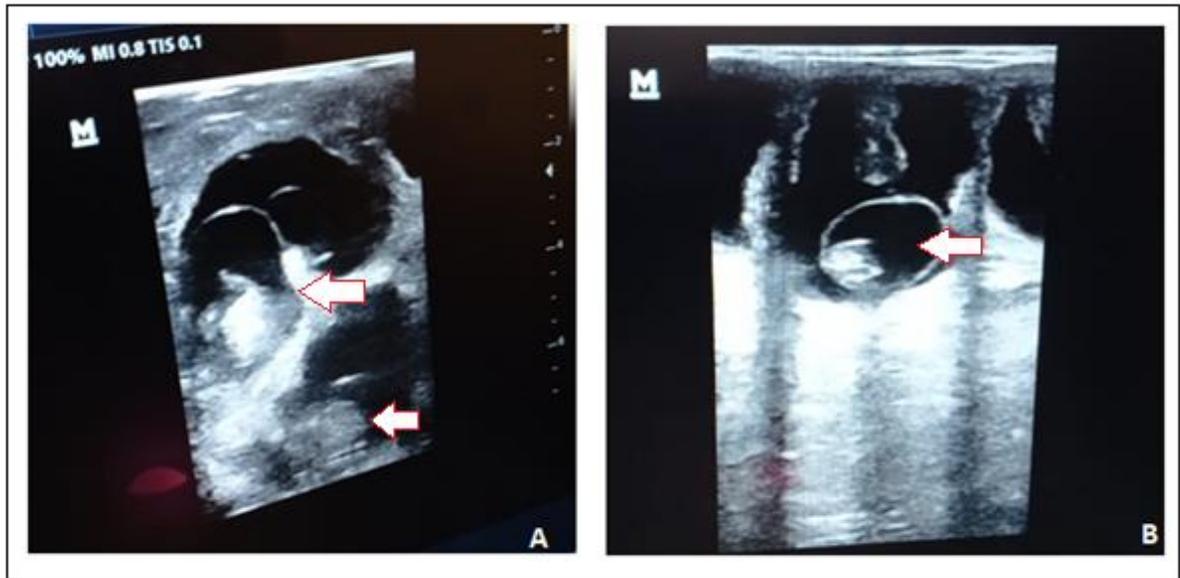


Figura 4 (A,B): Avaliação ultrassonográfica em modo-B, realizado aos 30 dias após a inseminação em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado. A: diagnóstico de prenhez gemelar, as setas demonstram os dois fetos; B: diagnóstico de prenhez simples, demonstrado pela seta.

ANÁLISE ESTÁTISTICA

Para análise da taxa de prenhez cumulativa foi utilizada o Teste Qui-quadrado. A taxa de gestação do diagnóstico precoce aos 17 dias com ultrassom doppler foi comparada com a taxa de gestação do diagnóstico confirmatório aos 30 dias com ultrassom modo-B pelo teste de Qui-quadrado. Os graus de irrigação do corpo lúteo foi avaliado no diagnóstico precoce das diferentes inseminações foi testada pelo Teste T student. Foi realizado o cálculo de indicadores do diagnóstico precoce (Tabela 3): Sensibilidade= $VP/(VP+FN)$, especificidade= $VN/(FP+VN)$, valor preditivo positivo= $VP/(VP+FP)$, valor preditivo negativo= $VN/(FN+VN)$ e acurácia= $(VP+VN)/n$, utilizando os valores verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso positivo (FP) e falso negativo (FN).

3. RESULTADOS

As taxas de prenhez finais dos grupos estão apresentadas na Tabela 1. O Controle foi superior ($P < 0,05$) ao Re-sync e ao Doppler, que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). Confirmando o diagnóstico precoce de gestação com ultrassonografia Doppler aos 30 dias podemos observar que não houve diferença entre as avaliações do diagnóstico preditivo de gestação precoce aos 17 dias, com o diagnóstico de gestação reavaliado aos 30 dias (Tabela 2). Os indicadores da técnica de diagnóstico de não-gestação aos 17 dias com auxílio de ultrassonografia Doppler foram: sensibilidade 100%, especificidade 28%, valor preditivo positivo 21,3%, valor preditivo negativo 100% e acurácia 39,8% (anexo, tabela 3).

Tabela 1: Taxas de prenhez aos 30 dias, determinada com ultrassonografia modo-B, após inseminação artificial ou monta natural dos diferentes grupos avaliados em ovelhas Santa Inês submetidas ou não a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado

	Re-sync	Doppler-IA	Controle
1ª IA	18,05% (13/72)	12% (9/75)	-
2ª IA	13,55% (8/59)	12,5% (5/40)	-
3ª IA	-	7,40% (2/27)	-
Taxa acumulada	29,16% (21/72) ^b	21,33% (16/75) ^b	83,33% (30/36) ^a

^{a, b} letras diferentes na linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 2: Taxa de prenhez com diagnóstico precoce por ultrassonografia Doppler aos 17 dias comparativo com o diagnóstico com ultrassonografia Modo-B aos 30 dias em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro com inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado

Doppler	D17	D30
1ª IA	46,66% (35/75)	12% (9/75)
2ª IA	30% (12/40)	12,5% (5/40)
3ª IA	18,51% (5/27)	7,40% (2/27)
Taxa final	69,33% (52/75)	21,33% (16/75)

($P > 0,05$).

A frequência dos graus de irrigação do corpo lúteo no diagnóstico precoce de gestação aos 17 dias foi semelhante ($P > 0,05$) e está mostrada na Figura 5.

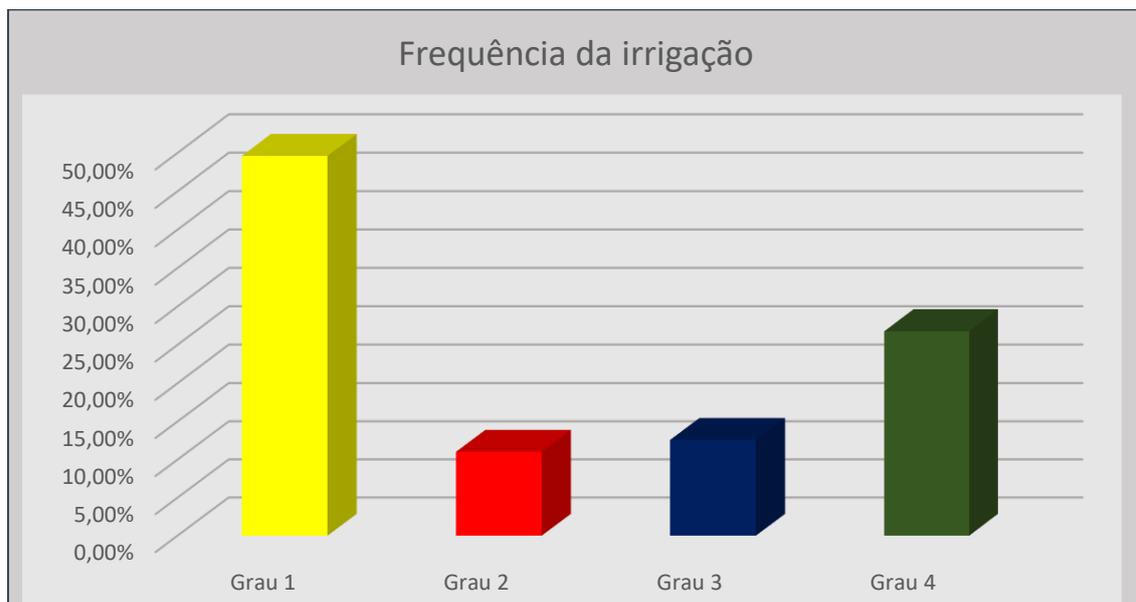


Figura 5. Frequência dos graus de irrigação do corpo lúteo no diagnóstico de gestação precoce com ultrassonografia Doppler aos 17 dias em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização.

Foram congeladas 24 partidas de sêmen, onde somente 15 atingiram os padrões aceitáveis na seleção, os resultados da avaliação do sêmen são apresentados no anexo , tabela 3.

4. DISCUSSÃO

Este trabalho buscou avaliar a eficiência do uso do sêmen congelado na ressincronização de estro com duas ou três sincronizações de estro seguidas de inseminação artificial por laparoscopia em ovinos, utilizando ou não o diagnóstico precoce aos 17 dias com auxílio de ultrassonografia Doppler. A ressincronização de estro em ovinos vem se mostrando uma alternativa para diminuir o intervalo entre inseminações nas fêmeas vazias do primeiro serviço e aumentar a taxa de prenhez ao final da estação de monta, possibilitando o aumento do emprego da inseminação artificial com sêmen congelado. Os trabalhos encontrados na literatura vem utilizando a ressincronização de estro em ovinos com a inseminação artificial cervical superficial com sêmen fresco alcançando resultados as taxas cumulativas entre 40 a 60% de prenhez (Miranda et al., 2018; Cosentino et al., 2019).

Os grupos de inseminação artificial com sêmen congelado obtiveram a taxa de prenhez cumulativa de 29,16% e 21,33% respectivamente nos grupos Re-sync e Doppler-IA. Os resultados de taxa de prenhez com inseminação artificial utilizando sêmen congelado variam entre 40 e 80%, no qual diversos fatores podem interferir nos resultados, tais como: estação do ano, flushing alimentar, condição corporal, fatores estressantes, protocolo hormonal, momento da IA, qualidade do sêmen descongelado e a resposta individual (Moraes, 2002). Existe muita variação entre as taxas de prenhez utilizando sêmen congelado, Martins et al. (2012), obtiveram a taxa de 38,1% de prenhez em fêmeas cruzadas Texel, enquanto Cardoso (2008) obteve a taxa de 61,7% na IA com sêmen congelado. Sugerindo no presente trabalho que a alimentação, condição corporal e manejo não influenciaram as taxas de prenhez alcançadas nas IA, já que foi possível observar que o grupo monta natural obteve a taxa de 83,33% de prenhez.

Para melhor sincronizar o momento da ovulação e, portanto, otimizar a taxa de prenhez com sêmen congelado das ovelhas no presente trabalho, foi realizada a aplicação de GnRH 30 horas após a retirada do dispositivo de P4. A utilização de GnRH em protocolos

de sincronização de estro tem como intuito principal a sincronização da ovulação, que pode ser adiantada em 17 horas em relação aos animais que não receberam GnRH, com a ovulação ocorrendo 57 horas após a retirada do dispositivo de P4 (Silva et al., 2015). É importante saber o momento da ovulação para determinar o melhor horário da inseminação artificial, no presente trabalho a IA ocorreu as 50 horas após a retirada do dispositivo de P4, sugerindo que o momento da IA ocorreu antes da ovulação, possivelmente diminuindo a viabilidade dos espermatozoides no momento da ovulação e conseqüentemente afetando a taxa de prenhez.

Mesmo com a consideração de falha na adequação do momento da IA com a ovulação, no trabalho, podem ter ocorrido perdas embrionárias no intervalo das avaliações, entre 17 e 30 dias. A ocorrência de perdas embrionárias em ovinos é cerca de 17,2 a 37,7%, podendo variar conforme a quantidade de ovulações e as causas podem ser as mais diversas que afetam a manutenção da gestação após 12 dias da cobertura, podendo chegar até 32 dias (Doney et al., 1976; Diskin and Morris, 2008). Cosentino et al. (2021), observaram uma taxa de perdas gestacionais de 20% entre 17 e 42 dias em ovelhas que demonstraram estro e foram inseminadas e diagnosticadas precocemente com ultrassonografia Doppler.

No presente trabalho os grupos de ressincronização de estro receberam outro dispositivo de progesterona dez ou vinte e três dias após a inseminação artificial sem saber o status gestacional, assim como realizado em Miranda et al. (2018), que demonstraram a possibilidade de ressincronização de estro e de outra IA sem alterar a gestação da primeira IA. Desta forma, no presente trabalho, foi realizado nas fêmeas diagnosticadas vazias, duas ou três inseminações com a ressincronização de estro iniciando antes mesmo do diagnóstico de gestação. Isso possibilitou a realização das inseminações artificiais dentro do mesmo período, sendo o Re-sync durando 62 dias e o Doppler-IA durando 68 dias até o diagnóstico de gestação final. No mesmo período o grupo controle permanecia em estação de monta com os carneiros, sendo que as ovelhas tiveram de duas a três chances de emprenhar, devido a duração do ciclo estral, assim como ocorreu nos grupos de inseminação artificial.

O diagnóstico precoce de não-gestação aos 17 dias obteve taxa de prenhez na 1ª IA 46,66%, 2ª IA 30% e na 3ª IA 18,51%, alcançando uma taxa cumulativa de 69,33%, entretanto ocorreu uma discrepância na taxa cumulativa de gestação quando confirmado o diagnóstico por ultrassonografia aos 30 dias (21,33%), o qual se mostrou inferior a taxa de prenhez esperada. A acurácia do diagnóstico de gestação precoce do presente trabalho foi de 39,8% sendo abaixo da acurácia da técnica demonstrada nos outros trabalhos, cerca de 87% (Arashiro et al., 2018; Santos et al., 2020). Cosentino et al. (2021), utilizando ressincronização de estro com diagnóstico precoce em ovelhas, obtiveram taxas na primeira IA de 46,7% (28/60)

de prenhez, confirmando o diagnóstico aos 42 dias após a IA obtiveram taxa de 58,3% (35/60) de prenhez.

Pode-se observar a incidência de 79% de falsos positivos durante a avaliação da irrigação do CL, no presente trabalho, Arashiro et al. (2018), encontraram a incidência de falsos positivos em torno de 8 a 16% durante a avaliação da irrigação do CL com ultrassonografia Doppler. O CL em sua fase jovem apresenta maior volume e irrigação ocorrendo entre o 6º e o 13º dia após a ovulação, se ocorrer a luteólise inicia-se a regressão do volume do CL e a diminuição da irrigação a partir do 16º dia (Bartlewski et al., 1999). A ocorrência de erros de avaliação da porcentagem de irrigação do CL pode ser devido a ciclos estrais mais longos, com o CL no momento da avaliação apresentando boa irrigação ou por luteólise tardia. Desta forma, sugere-se que os CL durante a avaliação aos 17 dias, no presente trabalho, quando tinham boa irrigação, possivelmente estavam em sua fase jovem, devido a um ciclo estral longo ou por uma ovulação tardia e não predizendo uma prenhez, corroborando com a hipótese de inadequação do horário da ovulação com o momento da IA

No presente trabalho, também foi possível observar durante as avaliações da irrigação do CL a alta frequência do grau um, ou seja, baixa irrigação compatível com o CL em luteólise, ao mesmo tempo que não houve diagnóstico falso negativo, sugerindo que não ocorreu erros de interpretação da técnica no diagnóstico precoce de fêmeas vazias. Importante para a utilização do protocolo de ressincronização de estro, já que o animal irá receber hormônios que levariam ao aborto se estivessem prenhes. Arashiro et al. (2018), consideraram que a porcentagem de irrigação do grau um devido à baixa ou ausente irrigação é mais facilmente identificada, entretanto tiveram dificuldade em distinguir os graus 2, 3 e 4 de irrigação do CL. Neste trabalho foi possível identificar as diferentes porcentagens de irrigação do CL caracterizando os quatro graus de avaliação, o grau 1 e 4 foram os mais facilmente identificados, entretanto não foi observada diferença entre eles.

A inseminação artificial por laparoscopia em ovinos com a utilização do sêmen congelado em protocolos de ressincronização de estro pode auxiliar para melhorar os índices reprodutivos diminuindo o intervalo entre inseminações e avançando no melhoramento genético do rebanho já que é possível utilizar carneiros com alto valor genético. Para utilizar as ferramentas reprodutivas modernas como a inseminação artificial e o diagnóstico de gestação precoce e obter bons resultados é necessário que, além da sanidade e nutrição das ovelhas, os protocolos de sincronização de estro sejam eficientes para sincronizar a ovulação, principalmente quando for utilizar o sêmen congelado.

5. CONCLUSÃO

A ressincronização de estro associada com a inseminação artificial por laparoscopia utilizando sêmen congelado pode ser aplicada em ovinos, entretanto não foi possível alcançar maior taxa de prenhez com duas ou três inseminações ao final da estação de monta com o protocolo de sincronização de estro utilizado.

A monta natural foi superior na taxa de prenhez final, entretanto com o uso da ressincronização de estro e o auxílio do diagnóstico precoce as ovelhas puderam ser inseminadas de duas a três vezes, o que dá oportunidade de uso de animais superiores por meio do sêmen congelado.

O diagnóstico de gestação precoce se mostrou efetivo em diagnosticar as fêmeas efetivamente vazias, podendo dar prosseguimento aos protocolos de ressincronização de estro.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ARASHIRO, E.K.N., UNGERFELD, R.; CLARIGET, R.P.; PINTO, P.H.N; BALARO, M.F.A.; BRAGANÇA, G.M.; RIBEIRO, L.S.; FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. **Theriogenology**, 106 p. 247-252, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.029>

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Animal reproduction science* 57, p. 51-66, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00059-7)

BRITO, C.R.C., et al. Protocolos de sincronização de estro de longa e curta exposição à progesterone em ovelhas e cordeiras. **XXI Encontro de Pós-graduação**, 5ª Semana Integrada UFPEL, 2019.

CAVALCANTI, A.S. et al. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.6, p. 1412-1418, 2012. ISSN 1806-9290

CARDOSO, E. Aspectos técnicos e econômicos da inseminação artificial utilizando sêmen fresco ou congelado em ovinos da raça Santa Inês. Dissertação de mestrado- Mestrado em Zootecnia, **UESB**. Itapetinga, 2008.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo horizonte, 2013: **CBRA**, 2013.

COSENTINO, I.O.; et al. Hormonal protocols for early resynchronization of ovulation in ewes: The use of progestagens, eCG, and inclusion of early pregnancy diagnosis with color Doppler ultrasound. **Theriogenology**, 133, p. 113-118, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.033>

COSENTINO, I.O.; et al. Fixed timed artificial insemination and early resynchronization of ovulation in diferente categories of ewes in grazing system: Response of multiparous, nulliparous, and lactating ewes during the breeding season. **Livestock Science** 247, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104461>

DONEY, J.M.; SMITH, W.F.; GUNN, R.G. Effects of pos-mating environmental stress or administration of ACTH on early embryonic loss in sheep. **J. agric. Sci., Camb.** N87, p. 133-136, 1976.

DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reprod. Dom. Anim.** n.43, p.260-267, 2008. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Zaragoza: Acribia, 1990.

MARTINS, L.H.S., et al. Sincronização de cios em ovinos com protocolo de curta ou longa duração de exposição ao progestágeno visando a inseminação por laparoscopia com semen descongelado. **Synergismus scyentifica** UTFPR, XV Simpósio Paranaense de Ovinocultura. Pato Branco, 2012.

MENCHACA, A., RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.** 16, 403–413, 2004. <https://doi.org/10.1071/RD04037>.

MIRANDA, V.O., OLIVEIRA, F.C., DIAS, J.H., VARGAS JÚNIOR, S.F., GOULARTE, K.L., SÁ FILHO, M.F., SÁ FILHO, O.G. D., BALDASSARRE, H., VIEIRA, A.D., LUCIA, T., GASPERIN, B.G. Estrus resynchronization in ewes with unknown pregnancy status. **Theriogenology** 106, 103–107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.019>.

MORAES, J.C.F. O emprego da inseminação artificial nas ovelhas. **Embrapa Circular técnica** n.25. Bagé, 2002. ISSN 0100-8625.

MORAES, E.P.B.X, et al. Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.148-155. 2008.

MOREIRA, N.H. Avaliação de diferentes alternativas para aumentar a eficiência da sincronia do estro e ovulação em ovelhas deslançadas. Tese de doutorado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, **Universidade de Brasília**. Brasília, 2016.

SANTOS, L.M. et al. Vascularização luteal e diagnóstico de gestação precoce em ovinos. **Comunicado técnico Embrapa**, n.207. Brasília, 2020. ISSN 0102-0110.

SILVA, B.D.M. et al. Ovulation induction in ewes using GnRH in long and short-term synchronization protocols. **Animal Reproduction**, v.12, n.2, p. 312-315. Belo Horizonte, 2015.

REYNA, J.; THOMSON, P.C.;MAXWELL, W.M.C. Synchrony of ovulation and follicular dynamics in Merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Reprod. Dom. Anim.** 42, p. 410-417, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00800.x

9.ANEXOS

Esse Experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob o protocolo CEUA/Cenargen 03/2019.

Tabela 3: Tabela de contingência dos indicadores do diagnóstico precoce aos 17 dias com ultrassom Doppler, determinando os parâmetros da técnica do presente trabalho. Foram utilizados os valores de referência: Verdadeiro positivo(VP=16), falso positivo (FP=59), verdadeiro negativo (VN=23), falsos negativo (FN=0)

Indicadores	Valores
Sensibilidade	100%
Especificidade	28%
Valor preditivo positivo	21,3%
Valor preditivo negativo	100%
Acurácia	39,8%

Tabela 4: Relação das partidas selecionadas de sêmen congelado dos carneiros que foram utilizados para a inseminação artificial nos protocolos de sincronização e ressincronização de estro em ovelhas Santa Inês. As partidas foram selecionadas de acordo com os seguintes valores mínimos: motilidade espermática \geq a 70%, motilidade progressiva \geq 40%, VCL (velocidade curvilínea) dos móveis \geq 167, MIAI/MI (membrana e acrossoma integro nas duas técnicas) \geq 30%

Partida	Carneiro	TTR 0 Hrs			CFDA 0 hrs		Fluorecência 0 Hrs FTTC				TTR 2 HRS			CFDA 2 hrs		Fluorecência 2 hrs FTTC			
		Mot	Progressiva	VCL	MI	ML	MIAI	MLAR	MLAI	MIAR	Mot	Progressiva	VCL	MI	ML	MIAI	MLAR	MLAI	MIAR
P3	4534	64	40	138	25	74	34	5	60	0	55	43	128	29	71	48	6	45	0,5
		60	46	170	30	69	33	5	62	0	65	41	102	29	71	35	23	41	0
		49	32	198	42	58	44	5	50	0	49	15	103	44	56	47	25	50	0,5
	Média	57,6667	39,333333	168,67	32,3333	67	37	5	57,3333	0	56,3333	33	111	34	66	43,3333	18	45,3333	0,3333
P5	4534	68	42	172	34	66	39	7	53	0	64	39	136	31	68	23	21	55	0
		22	7	71	2	98	4	17	78	0	15	2	46	4	96	4	18	77	0,5
		77	45	167	43	57	42	8	49	0	63	21	90	33	66	37	12	51	0
	Média	55,6667	31,333333	136,67	26,3333	73,67	28,3333	10,67	60	0	47,3333	20,66667	90,67	22,667	76,667	21,3333	17	61	0,1667
P7	4534	72	45	127	49	51	50	5	44	0	59	35	109	46	53	45	11	41	2
		62	49	161	37	62	47	7	46	0	58	45	152	30	70	32	23	40	4
	Média	67	47	144	43	56,5	48,5	6	45	0	58,5	40	130,5	38	61,5	38,5	17	40,5	3
P9	4534	71	52	183	40	60	44	6	50	0	44	33	111	37	62	39	16	42	2,5
		60	45	149	26	74	31	6	62	0	50	28	150	20	79	24	13	60	3
		62	52	160	37	62	39	0	60	0	62	34	149	37	62	41	11	44	3
	Média	64,33333	49,666667	164	34,3333	65,33	38	4	57,3333	0	52	31,66667	136,7	31,3333	67,667	34,667	13,33	48,667	2,8333
P6	4452	51	33	141	40	60	49	2	49	0	50	33	117	44	55	46	9	44	0,5
		77	59	167	45	55	43	2,5	54	0	63	28	104	45	55	50	10	39	0
	Média	64	46	154	42,5	57,5	46	2,25	51,5	0	56,5	30,5	110,5	44,5	55	48	9,5	41,5	0,25
P14	4534	89,5	61,8	169,82	85	15	80	2	12	6	89,3	63,3	146,5	65	35	58	0	28	14
		81,4	55,4	142,06	70	30	72	3	19	6	75,9	59,4	163,5	60	40	55	3	9	33
	Média	85,45	58,6	155,94	77,5	22,5	76	2,5	15,5	6	82,6	61,35	155	62,5	37,5	56,5	1,5	18,5	23,5
P15	4534	43,6	33,7	152,86	63	37	64	3	26	7	65,1	46,4	133,6	53	47	56	0	5	39
		63,8	49,3	144,65	65	35	67	4	22	7	24,5	5,1	119,1	58	42	59	1	10	30
	Média	53,7	41,5	148,76	64	36	65,5	3,5	24	7	44,8	25,75	126,4	55,5	44,5	57,5	0,5	7,5	34,5
P16	4534	59,8	53,3	145,94	70	30	68	2	24	6	78,5	61,7	121,3	50	50	40	1	14	45
		87,3	76,9	148,76	80	20	75	1	21	3	82,6	52,3	105,8	70	30	60	2	8	30
	Média	73,55	65,1	147,35	75	25	71,5	1,5	22,5	4,5	80,55	57	113,5	60	40	50	1,5	11	37,5
P17	4534	81,1	63,6	116,24	67	33	57	6	33	4	57,4	29,6	110,2	57	43	47	0	25	28
		87	54,3	166,95	65	35	70	2	20	8	65	21	47,12	55	45	45	4	26	25
	Média	84,05	58,95	141,6	66	34	63,5	4	26,5	6	61,2	25,3	78,68	56	44	46	2	25,5	26,5
P18	4534	69,4	55,9	229,32	63	37	57	3	37	3	41,1	24,3	132,4	40	60	32	27	24	17
		60,9	53,9	169,48	65	35	63	1	28	8	59,3	25,8	118,8	50	50	52	4	28	16
	Média	65,15	54,9	199,4	64	36	60	2	32,5	5,5	50,2	25,05	125,6	45	55	42	15,5	26	16,5
P19	4534	70,3	61,9	172,43	78	22	83	1	11	5	84,8	70,3	112,4	50	50	43	1	21	35
		95,3	72,1	145,47	80	20	75	1	18	6	63,8	37,3	132,9	70	30	60	11	13	16
	Média	82,8	67	158,95	79	21	79	1	14,5	5,5	74,3	53,8	122,7	60	40	51,5	6	17	25,5
P20	4534	82,4	51,3	169,98	77	23	67	1	28	4	86,4	52,8	130,5	60	40	55	3	7	35
		71,7	49,7	140,38	77	23	72	2	19	7	61,8	53,8	147,4	70	30	60	6	3	31
	Média	77,05	50,5	155,18	77	23	69,5	1,5	23,5	5,5	74,1	53,3	139	65	35	57,5	4,5	5	33
P21	4534	57,3	52,8	182,97	50	50	52	2	29	17	30,7	16,1	124,7	40	60	35	2	15	48
		85,4	52,6	115,65	65	35	55	1	26	18	65,4	22	93,12	60	40	50	11	18	21
	Média	71,35	52,7	149,31	57,5	42,5	53,5	1,5	27,5	17,5	48,05	19,05	108,9	50	50	42,5	6,5	16,5	34,5
P22	4534	69,8	53	131,52	71	29	61	14	17	7	60,8	33,3	88	55	45	50	0	13	37
		86	66,5	140,66	50	50	47	5	35	13	76,3	51	83,53	30	70	35	1	10	50
	Média	77,9	59,75	136,09	60,5	39,5	54	9,5	26	10	68,55	42,15	85,77	42,5	57,5	42,5	0,5	11,5	43,5
P23	4534	83,8	62,7	149,36	89	11	82	1	9	8	73,2	35,5	70,05	38	62	39	1	29	31
		68,8	51,2	134,12	60	40	62	10	15	13	65,1	42,5	121,7	40	60	37	6	22	34
	Média	76,3	56,95	141,74	74,5	25,5	72	5,5	12	10,5	69,15	39	95,86	39	61	38	3,5	25,5	32,5