



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Efeito dos diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em
programas de inseminação artificial em tempo fixo em ovinos**

Clarissa Neuman Ramos César

RECIFE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Efeito dos diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de inseminação artificial em tempo fixo em ovinos

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Clarissa Neuman Ramos César

Recife

2013

Ficha Catalográfica

C421e

César, Clarissa Neuman Ramos

Efeito dos diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de inseminação artificial em tempo fixo em ovinos / Clarissa Neuman Ramos Cesar. – Recife, 2013.

46 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.

Referências.

1. Período ovulatório 2. Taxa de prenhez 3. Estro
I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orientador II. Título

CDD 636.089

Dissertação à disposição da Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**Efeito dos diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de
inseminação artificial em tempo fixo em ovinos**

Clarissa Neuman Ramos César

CLARISSA NEUMAN RAMOS CÉSAR

Aprovada em 29 de abril de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Gustavo Ferrer Carneiro

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UAG**

Carlos Enrique Peña Alfaro

**Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro
Universidade Federal de Campina Grande - CSTR**

Cláudio Coutinho Bartolomeu

**Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV**

Rita de Cássia S. Cardoso

**Prof. Dra. Rita de Cássia Soares Cardoso
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UAG**

*Aos meus avós, em especial ao meu avô
Chico Ramos, dedico esse degrau da
minha vida profissional.*

AGRADECIMENTOS

Dou graças a Deus, que esta sempre ao meu lado me fortalecendo e guiando, o qual tem sido a melhor e principal companhia em minha nova vida, sendo sempre compreensivo, misericordioso e piedoso;

À minha família que sempre me incentivou e cobrou a realização e conclusão desse trabalho;

Ao meu orientador, que antes de o ser, sempre foi amigo e companheiro, tendo sempre muita paciência e estímulo para me orientar, corrigir e ensinar, tendo seu jeito peculiar de orientar (concordando com Pedro);

À coordenadora do LANAGRO/PE, Dra. Diana, e à minha ex-chefe Dra. Adriana Leite, agradeço por não terem colocado qualquer empecilho para que eu ingressasse no PGCAT, mas sim por estarem sempre me encorajando;

Aos meus amigos do LANAGRO (DIA/VIR, DIA/BAC, Cultivo Celular e ADM), pelo entusiasmo, alegria, fidelidade, companheirismo e conselhos;

Aos amigos e companheiros de ADAGRI, que sempre me apoiaram, o meu reconhecimento;

Aos meus amigos de coração - Andréa Vidal, Salomé Simões, Sildivane Silva, Neurisvan Guerra, Alonso Filho, Karla Malta, Joseane Montenegro, Marcus, Suely Ruth, Jordana Amador, Jackie Bastos, Ananda Santos, JP Rego, Russy, Dra. Izaura, Adilson Filho, Gil, João Eudes, André Brayner – agradeço por fazerem minha vida tão feliz e alegre e por estarem ao meu lado, em todos os momentos, mesmo quando quase 700Km nos separam;

A todos que contribuíram para a execução e termino desse trabalho, em especial: Valdir, Breno, Andréa Vidal, Neurisvan,

À coordenadora do curso, Prof^a. Marleyne, pela sua dedicação, paciência e preocupação com seus pupilos;

Aos demais docentes do PGCAT, pelo compromisso e solicitude para com os dicentes, em especial ao prof. Fábio.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE TABELAS..... | IX |
| RESUMO | X |
| ABSTRACT | XI |
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 CICLO ESTRAL..... | 13 |
| 2.2 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA..... | 14 |
| 2.3 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO | 15 |
| 2.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) | 16 |
| 2.5 USO DE SÊMEN CONSERVADO PELO FRIO..... | 18 |
| 3. OBJETIVOS..... | 21 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |
| 5. ARTIGO..... | 29 |
| 6. CONCLUSÃO | 46 |

LISTA DE TABELAS

TABELA I. Taxa de prenhez em ovelhas submetidas a IATF nos momentos pré e pós-ovulatórios, com uso de sêmen resfriado e congelado.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I.

Status ovariano após retirada do dispositivo intravaginal de progesterona

RESUMO

O uso da inseminação artificial acelera o melhoramento genético, evita a transmissão de doenças venéreas e facilita a realização de testes de progênie além de possibilitar que machos subférteis produzam filhos. Ultimamente, vem sendo utilizada com sucesso a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), na qual as fêmeas têm o estro induzido por tratamento hormonal, o que permite uma previsão da manifestação do estro e ovulações e, conseqüentemente, o momento ideal de inseminação. Objetivando, a partir do conhecimento do momento da ovulação, pré-determinar o período mais adequado para o momento da deposição do sêmen, resfriado e congelado, no trato reprodutivo da fêmea, em programas de IATF, vinte ovelhas tiveram o estro sincronizado com uso de progestágenos intravaginais (Progespon®, Coopers), por 12 dias e 400UI de gonadotrofina coriônica equina [eCG (Novormon®, Coopers)], para determinação dos momentos que antecedem e marcam a ovulação. Outras duzentas ovelhas, submetidas ao mesmo protocolo para sincronização do estro, foram divididas em 4 grupos para Inseminação Artificial, tendo sido utilizado sêmen refrigerado nos grupos 1 e 2 e sêmen congelado nos grupos 3 e 4. As ovelhas que compunham os G1 e G3 foram inseminadas $58 \pm 1h$ após retirada do persário (pré-ovulatório), e as que compunham os G2 e G4 foram inseminadas $64 \pm 3h$ após retirada do persário (pós-ovulatório). Os resultados foram observados através da confirmação de prenhez e os dados submetidos à análise estatística pelo Odds ratio com e nível de significância (p) inferior a 0,05. Tendo sido observado bons resultados quando utilizado sêmen refrigerado e congelado, respectivamente, nos períodos que antecederam (68% de prenhez) e ultrapassaram (64% de prenhez) as 60h, respectivamente, após retirada da fonte exógena de progestágeno.

Palavras chaves: período ovulatório, taxa de prenhez, estro

ABSTRACT

The use of artificial insemination (AI) accelerates the genetic improvement, prevents transmission of venereal diseases and facilitates testing of progeny besides enabling subfertile males to produce descendents. Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) has been used successfully in which females have their estrus induced by hormonal treatment, which allows a prediction of the manifestation of estrus and ovulation and therefore the ideal time of insemination. In order, from the knowledge of time of ovulation, pre-determine the most appropriate period for the time of deposition of semen, cooled and frozen in the female reproductive tract in FTAI programs, twenty ewes had their estrus synchronized using intravaginal progesterone (Progespon ®, Coopers) for 12 days and 400 IU of equine chorionic gonadotropin [eCG (Novormon ®, Coopers)], to determine the moments leading up to ovulation. Other two hundred ewes, submitted to same protocol for synchronization of estrus, were divided into 4 groups for Artificial Insemination, with cooled semen used in groups 1 and 2 and frozen semen in groups 3 and 4. The sheep from G1 and G3 were inseminated 58 ± 1 h after removal of progesterone intravaginal device (pre-ovulatory), and the sheeps from G2 and G4 were inseminated 64 ± 3 h after withdrawal of progesterone intravaginal device (post-ovulatory). The results were obtained through the confirmation of pregnancy and data were subjected to statistical analysis with odds ratio and level of significance (p) less than 0.05. It having seen observed good results when used cooled and frozen semen, respectively, in the periods preceding (68% pregnancy rate) and exceeded (64% pregnancy) the 60h, respectively, after withdrawal of exogenous source of progestagen.

Key words: ovulatory period, pregnancy rate, estrus

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos no Nordeste do Brasil representam uma importante atividade socioeconômica para os produtores rurais, sendo explorados principalmente para a produção de carne e pele (SELAIVE VILLAROEL et al.,1996). O consumo de carnes e derivados no país é altamente favorável à ovinocultura, e encontra-se em pleno processo de expansão, pois as estatísticas oficiais mostram um consumo médio de 0,700g habitante/ano (MICHELS et al., 2006).

Para acelerar o crescimento da produtividade, aliada ao melhoramento genético, pode-se vislumbrar a utilização de biotécnicas da reprodução como a sincronização do estro, a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) (CARNEIRO, 2008).

Dentre as biotécnicas da reprodução, a I.A é aquela que propicia maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento genético do rebanho (GOMES et al., 2010). Segundo LEÃO (2003), o uso da IA acelera o melhoramento genético, viabiliza a obtenção de produtos de reprodutores alojados em outros países ou até mesmo que já morreram, evita a transmissão de doenças venéreas e facilita a realização de testes de progênie além de possibilitar que machos subfêrteis produzam filhos.

Ultimamente, vem sendo utilizada com sucesso a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), na qual as fêmeas têm o estro induzido por tratamento hormonal, o que permite uma previsão da manifestação do estro e ovulações e, conseqüentemente, o momento ideal de inseminação (TRALDI, 2006). Esse trabalho objetiva, a partir do conhecimento da dinâmica folicular e do momento da ovulação, pré-determinar o período mais adequado para o momento da deposição do sêmen, resfriado ou congelado, no trato reprodutivo da fêmea, em programas de IATF, que resulte num maior índice de prenhez a fim de contribuir com a eficiência reprodutiva e melhoria da produtividade do rebanho nacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo Estral

Ovelhas são poliéstricas estacionais de dia curto, sendo suas atividades reprodutivas divididas em estações de anestro (início do inverno ao início do verão), de transição (verão) e de acasalamento (final do verão ao início do inverno) (FONSECA, 2005). Na espécie ovina, algumas raças têm ciclo estacional (ocorrem em determinadas estações do ano), enquanto outras ovulam o ano todo. A variação se dá não apenas em função da raça, mas também do ambiente e da alimentação (CUNHA et al., 2001).

O ciclo estral é um conjunto de eventos que se repetem sucessivamente, e em ovelhas têm duração de 17 ± 2 dias que se divide em fase luteal, estendendo-se desde o dia 0 até o dia 13 e uma fase folicular que compreende o dia 14 até o dia 17 (RUBIANES, 2000). A fase folicular, período em que os folículos crescem, dura cerca de 2 a 3 dias, e é caracterizada pelo comportamento de estro, pico do hormônio luteinizante (LH) pré-ovulatório e o surgimento da ovulação. A fase lútea é caracterizada pela presença de um ou mais corpos lúteos, e é quem determina a duração do ciclo (PINEDA, 1989).

O processo de foliculogênese tem início com a formação dos folículos durante a vida fetal, ou seja, ao nascimento a cordeira já tem determinado o número de folículos primordiais nas suas gônadas. A maioria desses folículos durante o seu crescimento vai se degenerar no processo conhecido como atresia folicular, enquanto, apenas uma minoria vai completar sua maturação e ovular (COSTA, 2007).

Durante o ciclo estral ocorre uma cadeia de eventos que se repetem até o impedimento da luteólise pela gestação ou pelo anestro estacional (COSTA, 2007). O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que são os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas produzidas pela adenohipófise e os esteróides secretados pelos ovários. O controle da secreção das gonadotrofinas durante o ciclo estral exige um delicado balanço entre as complexas interações hormonais. (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O sistema nervoso central, sob ação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), estimula a adenohipófise a sintetizar e secretar os hormônios LH e folículo estimulante (FSH), que estimulam, nos ovários, a esteroidogênese da progesterona e estrógeno, que se somam àqueles para promover o desenvolvimento dos folículos ovarianos e a ovulação (MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

Quando a concentração dos níveis plasmáticos de progesterona é inferior a 1ng/mL (SOUZA et al., 2008), inicia-se a fase folicular. Com elevação da concentração plasmática de estrógeno há o incremento nos pulsos de LH e desenvolvimento do comportamento sexual característico do estro. Os pulsos de secreção de LH aumentam progressivamente durante um período de 8 a 12 horas quando alcança o pico. A ovulação ocorre 24 horas após o pico de LH, iniciando a fase lútea do ciclo estral (CUMMING et al., 1971).

Na fase lútea alguns folículos ovarianos emergem sob aumento da concentração de FSH. Em função da elevada concentração de progesterona os pulsos de LH estão reduzidos, os maiores folículos dependentes regridem e uma nova emergência folicular se inicia. Essa emergência folicular seguida de involução é conhecida como onda folicular (EVANS et al., 2000).

2.2. Dinâmica Folicular Ovariana

Segundo BORGES et al. (2004), o processo contínuo de crescimento e regressão folicular é conhecido por dinâmica folicular.

Durante o período interovulatório em pequenos ruminantes, o crescimento folicular ocorre em padrões de ondas, tanto na estação de acasalamento (EVANS et al., 2000) como na estação de anestro (BARTLESWIKI et al., 1998) e no período de transição entre estas duas estações (RAVINDRA & RAWLINGS, 1997). O número de ondas foliculares por ciclo varia entre duas e quatro. Estas ondas emergem com intervalos de 4 a 6 dias, sendo que há uma interação entre os esteroides ovarianos e as gonadotrofinas responsáveis pela regulação da dinâmica folicular (RUBIANES, 2000).

Em uma onda folicular, três eventos podem ser morfológica e fisiologicamente caracterizados - o recrutamento, a seleção e a dominância - que são regulados pelo FSH e LH hipofisários, quanto à manifestação, manutenção e suspensão de cada um desses eventos (GINTHER et al., 1996).

As principais características da dinâmica folicular em ovinos foram listadas por MENCHACA e RUBIANES (2004), como se seguem: 1ª) a cada onda existe sempre um folículo atingindo o diâmetro ≥ 5 mm; 2ª) aquele maior folículo cresce ± 1 mm por dia durante 5 a 7 dias; 3ª) o tamanho do maior folículo difere a cada onda; 4ª) quando as concentrações séricas de progesterona aumentam, o intervalo entre ondas são menores e a renovação folicular é facilitada; 5ª) nas fases lútea intermediária e final, os folículos que não forem maior que 4mm não farão parte do fenômeno daquela onda; 6ª) os maiores folículos presentes no dia da luteólise serão os que irão ovular; 7ª) na maioria dos ciclos ovulatórios duplos, os folículos ovulatórios emergem

como parte de uma mesma onda folicular, podendo em alguns casos fazerem parte de diferentes ondas; e 8^a) as ovulações duplas ocorrem com um intervalo de 24 horas entre as mesmas.

Em ovelhas, o folículo pré-ovulatório inibe o crescimento de outros folículos presentes nos ovários em tempo de aparecimento. O aparecimento de novos folículos em crescimento, no entanto, é diminuída, mas não inibida, embora o seu crescimento subsequente seja finalmente suprimido (GONZALEZ-BULNES et al., 2001, 2004). O folículo dominante evita a sua própria regressão, mudando a sua dependência de FSH para LH (CAMPBELL et al., 1995). No entanto, quando a concentração de LH permanece baixa, grandes folículos apresentam-se extremamente dependentes de FSH sem estabelecer dominância. Este efeito, induzido pela diminuição do LH, explica os efeitos supressores da progesterona do corpo lúteo nos folículos dominantes em ovinos (ADAMS, 1999).

O folículo dominante é aquele que, para finalizar seu crescimento, tem a habilidade de alterar sua dependência do FSH pelo LH, adquirindo receptores nas células da granulosa para este hormônio. A dominância folicular ocorre quando um ou mais folículos antrais, numa onda, excedem os demais folículos em taxa de crescimento e tamanho, em ambos os ovários (GINTHER et al., 1996).

2.3. Sincronização do Estro

A sincronização do estro tem por finalidade fazer com que um grupo de ovelhas apresente este comportamento, em determinado momento, para realizar-se a cobertura natural ou artificial. As vantagens da sincronização do estro evidenciam-se na programação dos partos para épocas mais propícias. sobrevivência das crias, na promoção da uniformidade do rebanho e da produção de leite e carne, possibilitando também, a redução do intervalo entre partos (NUNES et al., 1997).

A duração normal do ciclo estral é de 17 dias para ovelhas (HAFEZ & HAFEZ, 2004) e os métodos empregados na manipulação do ciclo estral dos ovinos estão divididos em dois grupos: o método natural ou efeito macho e os métodos artificiais, com uso de hormônios (SILVA SOBRINHO, 2006).

O efeito macho consiste no afastamento de machos do rebanho por 60 dias, quando são reintroduzidos e induzem alto percentual de estro nas fêmeas em 72 horas. Sua aplicação é mais eficiente na estação de transição e pode ser associada com o uso de luz artificial (SASA et al., 2004). A ação dos machos ocorre pelo efeito dos feromônios na pulsação tônica do LH, aumentando sua frequência de liberação (NEVES et al., 1996).

Implantes de melatonina inseridos próximo ao solstício de verão podem ser usados para adiantar a estação reprodutiva em raças estacionais (HARESING et al., 1990), contudo longos períodos de exposição aos tratamentos com melatonina podem diminuir a taxa de ovulação (JORDAN et al., 1990).

O desenvolvimento folicular pode ser manipulado com o uso de gonadotrofinas e progestágenos exógenos (FONSECA, 2005).

Existem vários protocolos de indução de estro que utilizam variações na dose, duração, no tipo e na via de administração de progestágenos, no momento de aplicação de gonadotrofinas e uso ou não de prostaglandinas. Diversos são os progestágenos que podem ser utilizados para sincronizar o estro (Progesterona, Acetato de Fluorogestona-FGA, Acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou Norgestomet), bem como suas diferentes vias de administração (injeção intramuscular, implantes intravaginais, implantes subcutâneos para orelha) (BARIL et al., 1995).

Gonadotrofinas e prostaglandinas são administradas 24 a 48 horas antes ou no momento da retirada do dispositivo. Protocolos com longa permanência dos dispositivos (13-21 dias) têm dispensado o uso de prostaglandina (FONSECA, 2005).

Todos os protocolos têm apresentado elevados índices de animais em estro após a retirada do progestágeno, com taxas de gestação que variam de 50 a 80%, seja no uso da monta natural ou da IA (FONSECA, 2005).

O uso de prostaglandinas é importante para promover a lise do corpo lúteo, garantindo elevado número de animais que entram em estro precocemente após retirada do progestágeno (FONSECA et al., 2005). A via de administração de prostaglandinas é outro aspecto que pode variar, alcançando maior eficiência, quando administrada via intravulvosubmucosal (MELLADO et al., 1994).

2.4. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

A possibilidade no aumento da atividade reprodutiva passa necessariamente pela aplicação de manejos que permitam o aproveitamento pleno de animais considerados de alto potencial genético. Nenhuma outra técnica cumpre tão bem essa finalidade quanto à inseminação artificial, principalmente quando associada à criopreservação do sêmen (refrigeração e congelamento) (Bicudo, 2002).

A IA é considerada a biotécnica que permite que poucos machos selecionados produzam espermatozóides para inseminar centenas de fêmeas por ano (O'MEARA et al., 2008), e é bastante difundida na reprodução assistida de diversas espécies domésticas.

A inseminação artificial, apesar de apresentar maior possibilidade de fertilização, requer instrumentos de alto valor e mão-de-obra qualificada, o que tem dificultado a sua utilização com maior frequência de maneira comercial (CRUZ & FERRAZ, 2007).

Segundo TRALDI (1994) e GONZALES et al. (2002), essa técnica objetiva a introdução do sêmen nas vias genitais de fêmeas, podendo ser *in natura*, diluído, refrigerado ou congelado-descongelado, por meio de instrumentos, em condições que permitam que os espermatozóides encontrem o oócito e o fecunde.

A deposição do sêmen nas vias genitais femininas podem ocorrer por meio da IA vaginal, cervical, transcervical e intra-uterina. Na IA vaginal a deposição do sêmen ocorre o mais profundo possível, contudo sem a preocupação de localizar a cervix (BUCKERELL et al., 1991). Para deposição do sêmen na IA cervical se faz uso de um espelho para visualização das estruturas e o sêmen é depositado dentro da cervix (1 a 3 cm).

Quando o sêmen é depositado no útero, pela IA transcervical, é necessária a localização, retração e estabilização da cervix que permitam uma penetração intra-uterina, que só deve ser realizado em ovelhas grandes e multíparas devido à dificuldade causada pela anatomia da cervix da ovelha que é tortuosa e estreita impossibilitando muitas vezes a passagem da pipeta para deposição do sêmen (AX et al., 2004).

A inseminação intrauterina por laparoscopia consiste na deposição de pequenas quantidades de sêmen nos cornos uterinos, resultando em aceitáveis taxas de prenhez (FERRA & SERENO, 2006), porém, o alto custo dificulta seu uso em rebanhos comerciais (MILCZEWSKI et al., 2000). A técnica laparoscópica é a mais indicada para ovinos porque, a ovelha apresenta excelente competência no fechamento do canal cervical, decorrente do maior pregamento cervical interno determinando a formação de quatro a seis constrições (anéis) com intenso desalinhamento entre eles dificultando a transposição cervical por aplicadores de sêmen mesmo durante a vigência do estro (BICUDO et al., 2005).

A detecção de estro afeta diretamente a taxa de prenhez (número de animais gestantes em relação ao número de animais submetidos a IA), que resulta em aumento no intervalo de partos (IP), comprometendo a eficiência reprodutiva de um determinado rebanho (BARUSELLI et al., 2004).

A variabilidade das respostas aos protocolos de sincronização do estro e da ovulação (GUIDO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001; GUIDO et al., 2002) têm evidenciado a necessidade de maximizar a sincronização, principalmente da ovulação para equacionar a relação custo/benefício dos programas reprodutivos (GUIDO et al., 1999), além de possibilitar a IATF.

Quando a IATF é aplicada em um rebanho, hormônios adicionais são utilizados para garantir a mínima dispersão possível da ovulação entre as fêmeas. Gonadotrofinas hipofisárias e coriônicas tem sido largamente utilizadas em combinação com os tratamentos progestágenos e são necessárias durante a estação não sexual para induzir estro e ovulação. Durante a estação sexual, elas também são utilizadas para sincronizar a ovulação, melhorando a taxa de gestação após IATF (BORGES-BRANDAO, 2010).

A IATF poderá ser realizada entre 42 e 48h quando do uso de sêmen resfriado. Ovelhas adultas e borregas diferem quanto à resposta ao tratamento e momento de ovulação, e nas primeiras, a IA deve ocorrer 55h após a retirada do pessário e, nas últimas, 34 a 68h (TRALDI, 2006).

A deposição do sêmen congelado, por laparoscopia, dentro do útero é um método que proporciona taxas mais altas de concepção (48 a 100%) do que as observadas na IA cervical (9 a 65%), bem como permite o uso de menor dose inseminante (MAIA, 1999).

A definição de um momento ideal para realizar a IATF é controverso, visto o desconhecimento do momento preciso em que ocorrem as ovulações de doadoras sincronizadas pelos diferentes protocolos hormonais disponíveis. Gusmão (2006) recomenda que a primeira IATF, seja realizada 36 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Variação nesse momento é observada de acordo com o protocolo utilizado e principalmente quando se adiciona ao tratamento indutores de ovulação como GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofinas), LH e hCG (Gonadotrofina coriônica humana).

2.5. Uso de sêmen conservado pelo frio

A criopreservação do sêmen, associada à IA, oferece muitas vantagens à indústria da produção animal, principalmente quando relacionada à genética e programas de seleção (SALAMON & MAXWELL, 1995). Sua utilização resguarda os animais do estresse causado pelo transporte para fins de acasalamento e do risco de eventuais doenças transmissíveis durante a cópula, bem como favorece a preservação de material de alto valor genético por tempo indeterminado (SILVA et al., 2000; FUTINO, 2008).

O sêmen criopreservado é utilizado com êxito em poucas espécies, sendo problemática sua aplicação em outras (HOLT, 2000). O armazenamento do sêmen, particularmente congelado, determina mudanças bioquímicas e funcionais aos espermatozoides, resultando em redução da motilidade e da viabilidade, assim como danos durante o transporte e, conseqüentemente, afetando a fertilidade (LEBOEUF et al., 2000).

Os procedimentos usados para a criopreservação do sêmen (diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento) são bem conhecidos por causar danos à membrana plasmática dos espermatozoides (HAMMERSTEDT et al., 1990). É aceito que a criopreservação causa um decréscimo de aproximadamente 50% na viabilidade espermática decorrente de efeitos de temperatura e osmolaridade, alterando a organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica das membranas (AMANN & PICKETT, 1987; THOMAS et al., 1998).

As alterações nas membranas das células são associadas às mudanças de temperatura durante o processo de resfriamento, pelos efeitos deletérios dos componentes do meio e pelos efeitos do congelamento (WATSON, 1995).

Durante o congelamento as mudanças ocorridas nas membranas espermáticas são semelhantes às que ocorrem durante o processo de capacitação da célula espermática, o que leva a acreditar que ocorre uma redução na longevidade do espermatozoide criopreservado no trato reprodutivo feminino. A conservação do sêmen, no estado líquido (por pouco tempo), depende da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides em temperaturas baixas (EVANS e MAXWELL, 1990).

Perda da motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozoide, permeabilização e desestabilização das membranas como conseqüência de quebra da assimetria bilipídica, e geração de espécies reativas de oxigênio, são alguns dos danos, resultantes do processo de criopreservação do sêmen, que levam à fertilidade reduzida em programas de IA (WINDSOR & WHITE, 1995; WATSON, 1995, 2000).

O frio, na faixa dos 5 a 0°C, é um importante agente conservador por promover a redução do metabolismo celular para próximo ao estágio de quiescência, propiciando a estocagem prolongada e favorecendo o transporte do sêmen (PALHÃO et al., 2006), sendo imprescindível o controle da diminuição de temperatura (EVANS & MAXWELL, 1990) e o uso de substância lipoproteica que ofereça proteção contra o choque térmico (SALAMON & MAXWELL, 2000).

O armazenamento do sêmen, através da refrigeração, permite sua utilização por até 24 horas após sua colheita, com excelente resultado de fertilidade. Desta forma, é possível seu transporte, desde que se utilizem dispositivos isotérmicos adequados a este fim (BICUDO et al., 2005). Assim, o potencial de fertilidade espermática do sêmen refrigerado visando a utilização

na IA é prolongado, permitindo a programação das inseminações e o transporte das doses inseminantes (PICKETT, 1995 citado por BATELLIER et al., 2001).

SOUSA (2002) em estudo com IA cervical em tempo fixo em 64 ovelhas sincronizadas, utilizando dose com 200×10^6 espermatozoides, obteve uma taxa de prenhez de 41,9% utilizando sêmen fresco e 21,5% utilizando sêmen refrigerado em Equitainer[®] por 24h. Quando as inseminações foram realizadas em ovelhas com estro natural, a taxa de concepção com sêmen fresco foi de 78,6% e com sêmen refrigerado de 71,4%, não sendo observada diferença estatística.

As IA com sêmen fresco ou refrigerado ao serem comparadas às realizadas com sêmen congelado, apresentam maiores chances de popularização, por requererem técnicas menos sofisticadas de deposição do sêmen no genital feminino, equipamentos menos onerosos e menor rigor na cronologia do momento de inseminação. Deve-se levar em conta que a utilização de sêmen congelado possibilita uma maior pressão de seleção permitindo obter-se maior impacto sobre os programas de melhoramento genético e na dependência do estágio tecnológico do rebanho esta vantagem supera em muito as restrições técnicas impostas à sua utilização (BICUDO et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Esse trabalho objetivou determinar o melhor momento para IATF, baseado no status folicular ovariano de ovelhas com estro sincronizado, utilizando sêmen resfriado e congelado.

3.2. Objetivos Específicos:

Avaliar, com o uso da laparoscopia, os diferentes momentos da ovulação, identificando o intervalo de tempo em que ocorrem as ovulações, após cio sincronizado, de ovelhas em programa de IATF;

Determinar o percentual de prenhez obtido após IA, com sêmen refrigerado e congelado, no momento pré-ovulatório e pós-ovulatório, em ovelhas submetidas à sincronização do estro em programa de IATF.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* v.54, 17-32, 1999.

AMANN, R.P; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145-173, 1987.

AX, R.L.et al. Inseminação Artificial. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 531p.

BARIL, G. et al. **Manual de formacion practica para el transplante de embriones en ovejas y cabras**. Rome: FAO, p.175, 1995.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 275-285, 1998.

BARUSELLI, P.S. et al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1. 2004, Londrina. **Anais...**Londrina:[S.n.], 2004. P. 56-81.

BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Theriogenology**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BICUDO, S.D. **Sumário das Pesquisas em Reprodução Ovina Desenvolvidas na Fmvz – Unesp Botucatu**, 2002. Disponível em: <http://br.geocities.com/sonybicudo/temas.html>. Acessado em: 27/10/2009

BICUDO, S.D. et al. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinaria**. v.33, supl.1, p.127-130, 2005.

BORGES-BRANDÃO, G. S. **Uso da dinâmica folicular ovariana na avaliação de diferentes tratamentos de sincronização de estro em cabras canindé exploradas o semiárido do Nordeste do Brasil**. 2010, 94f. (Dissertação) - Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

BORGES, A. M. et al. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.80, n.5, p. 346-354, nov 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S0102-09352004000300010&nrm=iso>

BUCKERELL, B.C. et al. Artificial Insemination of small ruminants. **Theriogenology**, New York, v.10, p. 87-91, 1991.

CAMPBELL, B.K. et al. Control of follicle development and selection in sheep and cattle. **J Reprod Fertil Suppl**. v. 49, 335-350, 1995.

CARNEIRO, G.F. Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes.(Trabalho apresentado no 3º Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte - 3º SINCORTE, em João Pessoa, Paraíba, Brasil, Novembro 2007). **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.2, n.3, p.23-28, set. 2008. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v2_n3_set/tca04_biotecnicas.pdf> Acesso em 14.nov.2011.

COSTA, R.L.D.C. Aspectos reprodutivos das ovelhas. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 4, n.1, 2007.

CUMMING, I.A. et al. Regulation of oestrous cycle in the ewe. **Journal Reproduction Fertility**, v.24, n.1, p. 148-159, 1971.

CUNHA, E. A. et al. Desempenho e características de carcaça de cordeiros suffolk alimentados com diferentes volumosos. **Ciência Rural**; Santa Maria, v. 31, n.3, 2001, p.671-676. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n4/a18v31n4.pdf>> ISSN 0103-8478

CRUZ, J.F.; FERRAZ, R.C.N. Manejo Reprodutivo de Caprinos e Ovinos, **Núcleo deEstudo e Pesquisa em Produção Animal**, 2007.

EVANS, G.; MAXWEEL, W.M.C. **Salamon`s inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.

EVANS, A.C.O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v.53, n.1 p. 699-715, 2000.

FERRA J.C.; SERENO J.R.R. Inseminação artificial em ovinos. Planaltina: **Embrapa Cerrado**, 2006.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...Palestras. XVI CBRA, 16, 2005.** Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44472/1/AAC-Estrategias-para-o-controle.pdf>>

FONSECA, J.F. et al. Progesterone and behavioral features of estrous-induced Alpine goats. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.28, n.4, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432007001868>>

FUTINO, D. O. **Uso de glicerol, metil-formamida e dimetil-formamida como crioprotetores do sêmen canino.** 2008. 73f. (Dissertação) - Mestrado em Ciências Animais, Universidade de Brasília.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GUIDO, S.I. et al. Reutilização do controlled internal drug release (CIDR) e do programasyncro-mate-B para sincronizar o estro de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.367-369, 1999.

GUIDO, S. I. et al. Resposta ovulatória de receptoras caprinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 5, p.124-127, 2002.

GOMES, S.P. et al. Avaliação da Taxa de Fertilidade em Ovelhas Inseminadas com Sêmen Resfriado Comparada à Monta Natural. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde.** v.12, n.4, p.15-8, 2010.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Origin of the preovulatory follicle in mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on the growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. **Animal Reproduction Science.** v.65, 265-272, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432001000768>>

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. **Animal Reproduction Science**. v.84, 107-119, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003002550>>

GONZALES, I.M. et al. **Reprodução assistida em caprinos**. EMEPA - Paraíba, 42p, 2002.

GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião**, v.25, p.6-9, 2006.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7^a.ed. Barueri: Manole, 2004. 509p.

HARESIGN, W.; PETERS, A. R.; STAPLES, L. D.
The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. **Animal Production**, vol. 50, n. 1, p.111-121, 1990. DOI: 10.1017/S0003356100004517.

HOLT, W.V. Basic aspect of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-22, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000001524>>

JORDAN, B.T. et al. The effect of melatonin implantation in the middle of the breeding season on the subsequent reproductive activity of Scottish Blackface ewes. **Animal. Reproduction. Science**. v.23, p. 41-48, 1990.

LEÃO, K.M. **Técnicas de inseminação artificial**. 2003. 34p. Monografia Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. Disponível em: <<http://reocities.com/andbt/semi03/Karen.pdf>>

LEBOEUF, B. et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p.113-141, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000001561>>

MAIA, M.S. Inseminação artificial em ovinos. In: Seminário Nodestino de Caprino-Ovinocultura, 5, 1999, Recife. **Anais...** Recife, p. 147-150, 1999.

MELLADO, M. et al. Effect of prostaglandin F₂ α dosage and route of administration on estrus response in Criollo goats under range conditions. **Small Ruminant Research**, v.14, n.3, p.205-

208, 1994. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0921448894900426>>

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.1, p. 403-413, 2004.

MICHELS, I. et al. Proposta de elaboração de estudo da cadeia produtiva da ovinocultura em Mato Grosso do Sul. **Relatório Final**. Campo Grande: FAPEC, FCR, Sebrae, 2006, 97p.

MILCZEWSKI, V. et al. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.35-39, 2000.

MORELLO, H.H.; CHEMINEAU, P. Características Anatômicas e Funcionais do Sistema Reprodutor da Fêmea. In: AISEN, E.G. (Ed.) **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet, p.11-25, 2008.

NEVES, J. P. et al. Biotecnologia da reprodução em ovinos: inseminação artificial. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia - II Semana de Caprinocultura e Ovinocultura. **Anais...** p. 100-108, 1996.

NUNES, J. F. et al. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2º Ed. Fortaleza: Ed. Gnif. LCR, 1997.

OLIVEIRA, M. A. L. et al. Comparison of different protocols used to induce and synchronize estrus cycle of Saanen Goats. **Small Ruminant Research**, v.40, n.3, p.149-153, 2001.

O' MEARA, C.M. et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.69, n.4, p.513-522, 2008.

PALHÃO, M.P. et al. Uso do sêmen resfriado em programas de inseminação artificial em caprinos. **Embrião**, n. 26, p.6-7, 2006.

PINEDA, M.H. reproductive patterns of sheep and goat. In: McDONALD, L.E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4th ed. Philadelphia: Lea e Fabige, p. 428-447, 1989.

RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 279-289, 1997.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: **Controle Farmacológico Do Ciclo Estral Em Ruminantes**. São Paulo, p. 255-282, 2000.

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

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

SASA, A., et al. The use of artificial photoperiod associated to male effect and male effect alone on reproductive activity in Saanen goats under subtropical conditions in Brazil. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro, BA. **Anais ...** Porto Seguro: CBRA, ICAR, p.294, 2004.

SELAIVE-VILLARROEL, A B. et al. Estudo comparativo do desenvolvimento corporal pós-desmame de ovinos deslanados e caprinos na região semi-árida do Estado do Ceará. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1., 1996, Fortaleza, CE. **Anais...** Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. v. 1. p. 410-412.

SILVA, A.R. et al. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1021-1025, 2000. ISSN 0103-8478 Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n6/a17v30n6.pdf>>

SILVA SOBRINHO A.G. **Criação de ovinos**. Jaboticabal: Funep; 2006.

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema equitainer[®] na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. 2002. 104f. Dissertação - Mestrado Em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária E Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “ Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

SOUZA, M.I.L. et al. Secreção de esteróides ovarianos, em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, em distintos momentos reprodutivos, no Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4 . p. 1107-1113, 2008.

THOMAS, C.A. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, n.3 p. 786-793, 1998. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/58/3/786.short>>

TRALDI, A. de S. **Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico**. Texto apostilado, 1994.

TRALDI, A.S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: III Feira Internacional de Caprinos e Ovinos. 3, 2006, Pirassununga, São Paulo. **Anais...** III FEINCO, 3, 2006. CD Rom.

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

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

WINDSOR D.P., WHITE I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v.40, p. 43-58, 1995.

5. ARTIGO

O artigo, intitulado como segue na próxima página, será submetido à revista Ciência Rural, estando escrito e formatado conforme normas disponíveis em: <http://www.ufsm.br/ccr/revista/normas.htm>

Efeito dos diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de inseminação artificial em tempo fixo em ovinos
Effect of different times of laparoscopic artificial insemination programs at fixed time artificial insemination in sheep

Clarissa Neuman Ramos César^{I*}, Valdir Morais de Almeida^I, Carlos Henrique Peña Alfaro^{II}, Sérgio Santos de Azevedo^{II}, Andréa Helena Vidal^{III}, Gustavo Ferrer Carneiro^{IV}

^IPrograma de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil. E-mail: cla.neuman@gmail.com. *Autor para Correspondência.

^{II}Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Patos, CSTR/Patos, PB, Brasil.

^{III}Médica Veterinária Autônoma.

^{IV}Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE/Garanhuns, PE, Brasil.

RESUMO

Vinte ovelhas tiveram o estro sincronizado com uso de progestágenos intravaginais (Progespon®, Coopers), por 12 dias e 400UI de gonadotrofina coriônica equina [eCG (Novormon®, Coopers)], para determinação dos momentos que antecedem e marcam a ovulação. Outras duzentas ovelhas, submetidas ao mesmo protocolo para sincronização do estro, foram divididas em 4 grupos para Inseminação Artificial, tendo sido utilizado sêmen refrigerado nos grupos 1 e 2 e sêmen congelado nos grupos 3 e 4. As ovelhas que compunham os G1 e G3 foram inseminadas 58±1h após retirada do persário (pré-ovulatório), e as que compunham os G2 e G4 foram inseminadas 64±3h após retirada do persário (pós-ovulatório). Os resultados foram observados através da confirmação de prenhez e os dados submetidos à análise estatística pelo Odds ratio com e nível de significância (p) inferior a 0,05. Tendo sido observado bons resultados quando utilizado sêmen refrigerado e congelado, respectivamente, nos períodos que antecederam (68% de prenhez) e ultrapassaram (64% de prenhez) as 60h, respectivamente, após retirada da fonte exógena de progestágeno.

Palavras chaves: período ovulatório, taxa de prenhez, estro

ABSTRACT

Twenty ewes had the estrus synchronized using intravaginal progesterone (Progespon ®, Coopers) for 12 days and 400 IU of equine chorionic gonadotropin [eCG (Novormon ®, Coopers)], to determine the moments leading up to ovulation. Other two hundred ewes, submitted to the same protocol for synchronization of estrus, were divided into 4 groups for Artificial Insemination, with cooled semen used in groups 1 and 2 and frozen semen in groups 3 and 4. The sheep from G1 and G3 were inseminated 58 ± 1 h after removal of progesterone intravaginal device (pre-ovulatory), and the ones from G2 and G4 were inseminated 64 ± 3 h after withdrawal of progesterone intravaginal device (post-ovulatory). Results were obtained through confirmation of pregnancy and data were subjected to statistical analysis with odds ratio and level of significance (p) less than 0.05. It have seen good results when cooled and frozen semen were used, respectively, in the periods preceding (68% pregnancy rate) and exceeded (64% pregnancy) the 60h, respectively, after withdrawal of exogenous progestagen.

Key words: ovulatory period, pregnancy rate, estrus

1 INTRODUÇÃO

2

3 No Brasil a exploração de ovinos para corte ainda se apresenta como uma atividade com
4 múltiplos propósitos e, em geral, explorada com o uso de poucas tecnologias apropriadas
5 (SIMPLÍCIO & SIMPLÍCIO, 2007).

6 A inseminação artificial (IA) apresenta-se como uma técnica de incremento reprodutivo,
7 sendo a adequada seleção dos atributos produtivos e reprodutivos de machos e fêmeas
8 fundamental para a maximização do potencial dessa técnica (GILBERTI E MONREAL, 2008).

9 O crescimento da inseminação artificial tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento
10 da tecnologia para utilização de sêmen congelado, cujo uso tem sido limitado em razão dos
11 baixos índices de fertilidade conseguidos com a inseminação via cervical nos ovinos
12 (MAXWELL & WATSON, 1996). No carneiro, alguns aspectos da criopreservação promovem,
13 na membrana espermática, uma maturação excessiva e aumenta precocemente a proporção de
14 espermatozoides capacitados e acrossoma reagidos (HOLT, 2000).

15 A menor longevidade do sêmen ovino descongelado leva à necessidade da utilização da
16 I.A intra-uterina, depositando-se o sêmen próximo ao sítio de fecundação por meio da
17 laparoscopia para que se alcance taxas de fertilidade comparáveis ao sêmen a fresco na I.A.
18 cervical ou vaginal (BICUDO et al., 2007).

19 As técnicas de IATF são fundamentadas em protocolos que têm a função de induzir e
20 sincronizar o cio no período após o parto ou próximo à puberdade. Esses protocolos possibilitam
21 - com o uso de progestágenos, gonadotrofinas e outros hormônios - controlar a duração do
22 crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, sincronizar e induzir a ovulação sincronizada
23 em vários animais simultaneamente (BARUSELLI, 2005), viabilizando a realização da IA em
24 data e horário previsto, em grande número de animais num curto período de tempo.

25 Quando se utiliza a criopreservação associada à sincronização de estro em ovelhas, é
26 necessário ultrapassar a cérvix e depositar o sêmen em região profunda do útero para se

27 conseguir taxas de prenhez aceitáveis (ANEL et al., 2006). As IA com sêmen fresco ou
28 refrigerado ao serem comparadas às realizadas com sêmen congelado, apresentam maiores
29 chances de popularização, por requererem técnicas menos sofisticadas de deposição do sêmen no
30 genital feminino, equipamentos menos onerosos e menor rigor na cronologia do momento de
31 inseminação (BICUDO et al., 2005). Deve-se levar em conta que a utilização de sêmen
32 congelado possibilita uma maior pressão de seleção permitindo obter-se maior impacto sobre os
33 programas de melhoramento genético e na dependência do estágio tecnológico do rebanho esta
34 vantagem supera em muito as restrições técnicas impostas à sua utilização (BICUDO et al.,
35 2005).

36 Em sêmen de ovinos têm-se observado que a criopreservação causa capacitação precoce
37 após a descongelação (WATSON, 1995), e que mudanças na membrana do espermatozóide
38 podem afetar a motilidade e encurtar a vida das células, reduzindo ou incapacitando a fertilização
39 (TILBURG et al., 2008). Os resultados, para o uso do sêmen congelado, são dependentes do
40 número de espermatozoides viáveis disponíveis para a fertilização no momento da ovulação, o
41 que é também intensamente afetado pela redução do período necessário para a capacitação dos
42 espermatozoides após a congelação. Os resultados de prenhez em inseminações cervicais são
43 muito variáveis, oscilando desde 0% até 40%, sendo que resultados mais repetitivos podem ser
44 alcançados com a deposição uterina do sêmen (MORAES, 2002).

45 SOUSA (2002) em estudo com IA cervical com tempo fixo em 64 ovelhas sincronizadas,
46 com aproximadamente 200×10^6 espermatozoides, obteve uma taxa de prenhez de 41,9%
47 utilizando sêmen fresco e 21,5% utilizando sêmen refrigerado em Equitainer[®] por 24h. Quando
48 as inseminações foram realizadas em ovelhas com estro natural, a taxa de concepção com sêmen
49 fresco foi de 78,6% e com sêmen refrigerado de 71,4%, não sendo observada diferença
50 estatística.

51 Este estudo procurou, a partir do conhecimento do status folicular ovariano com
52 identificação da ovulação, pré-determinar o período mais adequado para o momento da

53 deposição do sêmen, resfriado e congelado, no trato reprodutivo da fêmea, em programas de
54 IATF, que resulte num maior índice de prenhez a fim de contribuir com a eficiência reprodutiva
55 e melhoria da produtividade do rebanho nacional.

56

57 MATERIAL E MÉTODOS

58

59 O estudo foi desenvolvido na cidade de Limoeiro (latitude 07°52'29" sul e
60 longitude 35°27'01" oeste, altitude de 138 metros), estado de Pernambuco. Foram utilizadas
61 duzentas e vinte fêmeas ovinas, Santa Inês, adultas, pluríparas, idade entre 20 e 50 meses, não
62 prenhes, não lactantes, com peso médio de $50 \pm 5,5$ kg. Após identificação, todos os animais
63 foram separados e submetidos a um período de adaptação e socialização do grupo por um
64 período de 30 a 40 dias, em manejo semi-intensivo, recebendo suplementação concentrada (200g
65 de ração comercial), sal mineral e água *ad libitum*. Aos 15 dias do início da sincronização do
66 estro, houve aumento do concentrado energético, *flushing* alimentar, promovendo o balanço
67 energético positivo das fêmeas.

68

69 Experimento I

70

71 A sincronização do estro, de vinte ovelhas, foi realizada com o uso de dispositivos
72 intravaginais (Progespon®, Coopers), por 12 dias e 400UI de gonadotrofina coriônica equina
73 [eCG (Novormon®, Coopers)], aplicada no momento da remoção da esponja, quando receberam
74 macho vasectomizado por até 60 horas. Após detecção do cio e às 36 horas da remoção das
75 esponjas, as fêmeas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico por 12 horas.

76 As observações do status ovariano foram realizadas via laparoscopia, nos momentos 48,
77 52, 56, 60, 64, 68 e 72 horas após remoção das esponjas ou até que a ovulação fosse detectada.

78 No momento que antecedeu às avaliações laparoscópicas as fêmeas foram submetidas à
79 tricotomia da região paramamária com gilete (Gillete®), água e sabão, e a região foi desinfetada
80 com iodo tópico (Biocid® - Pfizer). O procedimento laparoscópico se deu como em MEDEIROS
81 et al. (2002), e para tanto, as ovelhas foram sedadas, com associação de cloridrato de xilazina
82 (Rompum® - Bayer), na dose de 0,1mg/Kg, e Cloridrato de Cetamina (Cetamin® - Syntec), na
83 dose de 2mg/Kg, posicionadas em decúbito dorsal e inclinadas a um ângulo de 45°.

84 Os parâmetros utilizados para determinar o status ovulatório ovariano foram: presença
85 de folículo em emergência folicular, indicativos da condição pré-ovulatória, e folículo rompido,
86 indicativo de condição pós-ovulatória.

87

88 Experimento II

89

90 Com base nos resultados do Experimento I, foram definidos dois momentos para a
91 deposição do sêmen no útero, por via laparoscopia, sendo um na resposta ovariana pré-ovulatória
92 (58h ±1h) e o outro na resposta ovariana pós-ovulatória (64h ±3h)

93 Foram utilizadas duzentas ovelha sincronizadas utilizando-se o mesmo protocolo
94 aplicado nas ovelhas submetidas ao experimento I. Após detecção do estro as ovelhas
95 sincronizadas foram separadas em 04 grupos para realização da IATF, tendo-se como critério o
96 momento da deposição do sêmen, se pré-ovulatório ou pós-ovulatório, e o sêmen utilizado na
97 Inseminação, se refrigerado ou congelado/descongelado, conforme tabela I.

98 As inseminações foram realizadas por laparoscopia como descrito por Medeiros et al.
99 (2002) após sedação, com associação de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer), na dose de
100 0,1mg/Kg, e Cloridrato de Cetamina (Cetamin® - Syntec), na dose de 2mg/Kg, e
101 posicionamento em decúbito dorsal com inclinação a um ângulo de 45°, e prévia à tricotomia da

102 região paramamária com gilete (Gillete®), água e sabão, e desinfecção da região com iodo
103 tópico (Biocid® - Pfizer).

104 O sêmen, refrigerado e congelado/descongelado foi de origem comercial, adquirido em
105 central idônea e regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
106 (MAPA), com certificação de qualidade.

107 As fêmeas, inseminadas por laparoscopia, mantidas sob mesmo manejo, foram
108 avaliadas quanto ao estado gestacional por meio de ultrassonografia aos 35 dias da IA, por via
109 transabdominal, com aparelho Aloka SSD 500 (Aloka Co., Ltda., Tokio, Japan) e transdutor
110 convexo de 3,5MHz.

111

112 Análise Estatística

113

114 Os dados obtidos no Experimento I, foram avaliados correlacionando os índices
115 percentuais, das frequências do status ovariano (presença de folículos em emergência indicativo
116 da condição pré-ovulatória; e folículo rompido, indicativo de ovulação), com o momento
117 ovulatório (hora).

118 Para a comparação da taxa de prenhez entre os grupos foi realizada análise univariável
119 com o cálculo da *odds ratio* e respectivo intervalo de confiança de 95%, e teste de hipóteses
120 efetuado com o teste não-paramétrico de qui-quadrado (Zar, 1999). O nível de significância
121 adotado foi de 5%, e as análises foram realizadas com o programa EpiInfo versão 6.04.

122

123 RESULTADOS E DISCUSSÃO

124

125 Os resultados do primeiro experimento permitiram conhecer o status ovulatório ovariano
126 e determinar os melhores momentos para a IATF. Foi observada que a ovulação começou a ser

127 evidenciada a partir da terceira observação que ocorreu às 56h após retirada do Progespon[®],
128 totalizando 100% às 68 horas, tendo o maior número de ovulações se concentrado no intervalo
129 entre 64 e 68 horas, como pode ser observado na figura I.

130 Comparando com os protocolos de sincronização comumente utilizados, a identificação
131 das ovulações obtidas nesse trabalho, ocorreram mais tardiamente. As observações, neste
132 trabalho, divergem das relatadas por CARDWELL et al. (1998) que quando trabalhando com
133 ovelhas mestiças, identificaram, utilizando progestágenos combinados com eCG, que as
134 ovulações se manifestam mais rápida e uniformemente, como resultado dessa associação.

135 Estas diferenças entre resultados podem apontar que, possivelmente, em ovelhas da raça
136 Santa Inês a ovulação pode ser mais tardia. Conseqüentemente, a utilização de sêmen congelado
137 48 horas após a remoção do dispositivo vaginal reduz os índices de prenhez por não haver
138 proximidade do momento da ovulação com a oferta de sêmen, uma vez que o sêmen congelado
139 apresenta menor viabilidade no trato reprodutivo da fêmea, por volta de seis horas (WATSON,
140 2000).

141 Quando as ovelhas foram submetidas à IATF utilizando sêmen congelado e resfriado em
142 ambos os momentos da ovulação, pré e pós ovulação, se avaliou a diferença na taxa de prenhez,
143 grupo a grupo, não tendo sido significativa apenas entre os grupos G1 e G4, e G2 e G3 (tabela I).

144 Durante o período pré-ovulatório, o sêmen refrigerado apresentou melhores índices de
145 prenhez do que quando utilizado no pós-ovulatório, como também apresentou melhor
146 desempenho que o sêmen congelado, no pré-ovulatório.

147 O sêmen congelado teve melhor desempenho quando utilizado no período pós-ovulatório,
148 tendo apresentado-se, também, mais adequado do que o refrigerado, para uso nesse período. .

149 Das fêmeas inseminadas, mais de 60h após retirada da progesterona exógena, com sêmen
150 congelado, 64% apresentaram-se positivas no exame de prenhez, enquanto que apenas 28% das
151 fêmeas inseminadas com sêmen de igual qualidade apresentaram-se prenhes quando o
152 procedimento foi realizado em período inferior a 60h após retirada da progesterona exógena.

153 Também GILBERTI et al., (2008) observou maior índice de prenhez confirmada em ovelhas
154 deslanadas inseminadas, com sêmen congelado, 60h após retirada do CIDR[®], sugerindo como
155 momento adequado para realização da IATF, com sêmen congelado, o intervalo entre 48 e 60h,
156 resultado que se aproxima desse trabalho, onde observamos como intervalo mais apropriado,
157 para a IATF com sêmen congelado, o que encontra-se entre 60 e 68h. Resultados parecidos
158 foram obtidos por MOSES et al. (1997) quando inseminaram marrãs e ovelhas adultas 60h após
159 remoção do dispositivo vaginal.

160 Em 1986, EVANS et al. afirmaram que o momento da inseminação é muito mais crítico
161 quando se utiliza sêmen congelado, uma vez que o número de óvulos fertilizados em ovelhas
162 superovuladas inseminadas com sêmen congelado por via intra-uterina às 64 horas após a
163 retirada das esponjas foi significativamente maior em relação às 24 ou 44 horas, não havendo
164 diferença entre os horários de 24, 44 ou 64 horas quando utilizaram sêmen fresco.

165 Quando se utilizou sêmen refrigerado obteve-se 68% de prenhez no período que
166 antecedeu a ovulação, enquanto após a ovulação observou-se apenas 36% de ovelhas prenhes,
167 resultado já esperado considerando que conforme considerações de SOUZA et al. (1995), a
168 ovulação ocorre $65,1 \pm 2,2$ horas após a retirada das esponjas.

169 Bons resultados também foram encontrados por MILCZEWSK et al. (2000) que
170 registraram 85,71% de prenhez após IA, em ovelhas, por via laparoscópica utilizando sêmen
171 refrigerado às 55 ± 1 h. Quando essa autora comparou IA cervical com uso de sêmen refrigerado
172 em dois momentos, às 49 ± 1 h e 57 ± 1 h, identificou maior fertilidade do sêmen, com 43,75% de
173 prenhez, no segundo momento da deposição do sêmen.

174

175 CONCLUSÃO

176

177 Foi observado, para esse estudo, que a Inseminação Artificial pode ser iniciada 60h após
178 retirada da fonte de progestágeno exógeno, sem prévia identificação do cio com uso de rufião,

179 apresentando-se como melhor opção nesse período o uso do sêmen congelado. O sêmen
180 refrigerado é mais adequado quando a IA anteceder as 60h pós retirada do progestágeno.

181

182 COMITÊ DE ÉTICA

183

184 A realização do presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética conforme protocolo

185 número 27/2012

186

**ASSOCIAÇÃO DE ENSINO E CULTURA PIO DÉCIMO
FACULDADE PIO DÉCIMO**



Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "CORRELAÇÃO DO USO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO COM A IDENTIFICAÇÃO DO MELHOR PERÍODO OVULATÓRIO EM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM TEMPO FIXO", protocolo nº 27/2012, utilizando 220 (duzentas e vinte) ovelhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade Pio Décimo e foi aprovado em reunião do dia 20/12/2012.

(We certify that the Research "CORRELATION OF USE CRYOPRESERVED SEMEN WITH IDENTIFICATION OF THE BEST IN OVULATORY ARTIFICIAL INSEMINATION PROGRAM FIXED TIME WITH ", protocol number 27/2012, utilizing 220 (Two hundred twenty) sheep, under the responsibility of Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, conforms to the ethical principles of animal experimentation of the Committee on Bioethics of Faculty Pio Tenth and was approved in a meeting held on 20.12.2012).

Aracaju, 21 de dezembro de 2012.


Prof. Dr. Emerson Israel Mendes
Presidente da Comissão de Bioética
Faculdade Pio Décimo



Associação de Ensino e Cultura Pio Décimo
Campus I: Rua Estância 362/382 – Bairro Centro – Aracaju – Sergipe – Telefones: +55 (79) 2106-3050 – Fax: (79) 3211-3363
Campus II: Av. Augusto Franco, 2685 – Bairro Ponto Novo – Aracaju – Sergipe – Telefone: +55 (79) 3225-7075
Campus III: Av. Tancredo Neves, 5655 – Bairro Jaboatã – Aracaju – Sergipe – Telefones: +55 (79) 3234-8400 – Fax: 3234-8429
www.piodecimo.com.br

187

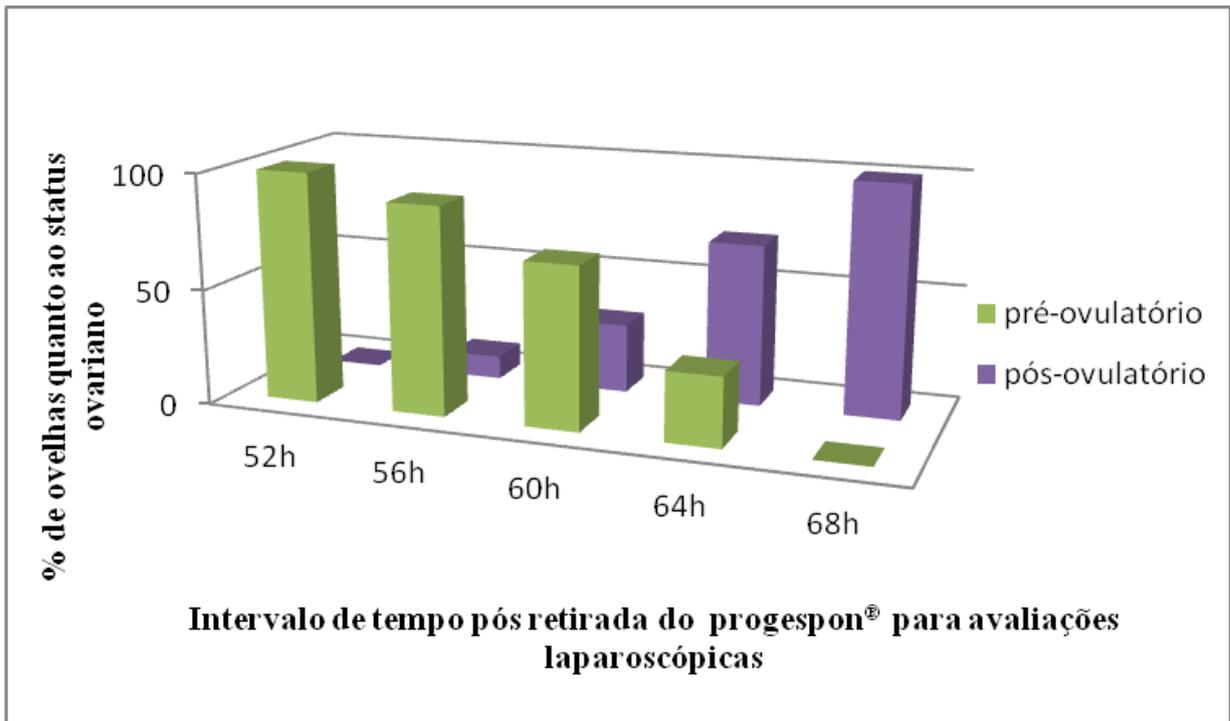
188

189

190

191

192



193

194 **Figura I. Status ovariano após retirada do dispositivo intravaginal de progesterona**

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209 **Tabela I. Taxa de prenhez em ovelhas submetidas a IATF nos momentos pré**
 210 **e pós-ovulatórios, com uso de sêmen resfriado e congelado**

| Grupos | Número total de animais | Taxa de prenhez (%) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| IATF pré-ovulatório, sêmen resfriado (G1) | 50 | 68,0 (34) ^{a,d} |
| IATF pós-ovulatório, sêmen resfriado (G2) | 50 | 36,0 (18) ^b |
| IATF pré-ovulatório sêmen congelado (G3) | 50 | 28,0 (14) ^{c,b} |
| IATF pós-ovulatório sêmen congelado (G4) | 50 | 64,0 (32) ^d |

211 IATF = Inseminação Artificial em Tempo Fixo;. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas
 212 ($p > 0,05$; IC 95%).

213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221

222 **REFERÊNCIAS**

223 ANEL, L. et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in**
224 **Domestic Animals**, Berlin, v. 41, supl. 2, p. 30-42, 2006.

225 BICUDO, S.D. et al. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae**
226 **Veterinaria**. v.33, supl.1, p.127-130, 2005..

227 BICUDO, S.D. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em
228 programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae**
229 **Veterinariae**. v.35, supl. 3, p.787-798, 2007.

230 BARUSELLI, P. Introdução da IATF no manejo reprodutivo de rebanhos bovinos de corte no
231 brasil. In: V Simpósio Internacional de Reprodução Animal, **Anais...** 5, 2005.

232 CARDWELL, B.E.; FITCH, G.Q.; GEISERT, R.D. Ultrasonic evaluation for the time of
233 ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by pregnant mare's serum
234 gonadotropin. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2235-2238, 1998.

235 CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. HENRY, M.N., JP. 2^a
236 ed., Belo Horizonte, 1998. 49p.

237 EVANS, G. et al. Time of intrauterine insemination of superovulated ewes using fresh and
238 frozen semen. **Anais...** Proc. 18th Annu. Conf. Aust. Soc. Reprod. Biol. p. 18, Canberra, 1986.

239 EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**.
240 Sydney:Butterworths, 1987. 194 p.

241 GILBERTI, M.; MONREAL, A.C.D. Identificação do intervalo de tempo fixo para o emprego
242 da inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado em ovelhas Santa Inês. **Agrarian**,
243 v.1, n.2, 2008.

244 GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião**, v.25, p.6-9,
245 2006.

246 HOLT, W.V. Basic aspect of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-22, 2000.
247 Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000001524>>

248 MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen.
249 **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996. doi: 10.1016/0378-4320(96)01544-8.

250 MEDEIROS, A.L.N. et al. Inseminação laparoscópica a campo em ovelhas mestiças no Sertão
251 Central do Ceará (dados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 5, supl. p.
252 84-86, 2002.

253 MILCZEWSKI, V. et al. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando
254 sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.35-39, 2000.

255 MORAES J.C.F. O emprego da inseminação artificial nas ovelhas. Bagé, RS: Embrapa Pecuária
256 Sul. **Circular Técnica 25**, 1ªed., 2002.

257 MOSES, D., et al. A large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-
258 thawed semen in australian merino sheep in argentine patagonia. **Theriogenology**, v.48, p.651-
259 57, 1997.

260 OLIVEIRA, M. E. F. **Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e**
261 **superovulação em ovelhas Santa Inês**. 2011, 131f, (Tese) - Universidade Estadual Paulista
262 “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011.

263 Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55107/1/TS-Dinamica->
264 [folicular.pdf](#)

265 SIMPLÍCIO, A.A; SIMPLÍCIO, K.M.M.G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: Desafios e
266 oportunidades. **Capril Virtual**. 2007. Disponível em: www.caprilvirtual.com.br

267 SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema equitainer[®] na refrigeração do sêmen ovino avaliado**
268 **pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial.**
269 2002. 104f. Dissertação - Mestrado Em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina
270 Veterinária E Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “ Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

271 SOUZA, C.J.H. et al. Momento da ovulação em ovelhas Corriedale após cio natural e induzido
272 com progestágeno e eCG. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p.277-281, 1995.

273 TILBURG M.F. et al. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. **Ciência**
274 **Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.731-739, 2008.

275 WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and
276 the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-891, 1995.

277 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
278 **Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2

279

280

281

282

6. CONCLUSÃO

Com esse trabalho podemos concluir que a identificação do momento da ovulação trata-se de uma importante ferramenta e que possibilita pré-determinar o momento mais adequado para realização da IATF, adequando o momento da inseminação com a qualidade e forma de conservação da dose inseminante, se refrigerado ou congelado.

Pôde-se ainda evidenciar que, em virtude dos danos causados no processo de criopreservação do sêmen, similares ao que ocorre na capacitação espermática, esse material apresenta-se mais adequado para uso quando a ovulação já tenha ocorrido, em virtude de que o sêmen apenas refrigerado ainda necessita passar pelo processo de capacitação espermática podendo alcançar o oócito para fertilização mais tardiamente.

Conclui-se que a IATF é um procedimento viável que reduz os custos por possibilitar a realização de um programa de sincronização de estro com número considerável de fêmeas a serem inseminadas num mesmo momento.