

“POSSIBILIDADES E LIMITAÇÕES DA INSEMINAÇÃO COM SÊMEN OVINO REFRIGERADO E BIOTÉCNICAS ASSOCIADAS COMO ESTRATÉGIAS DE INTENSIFICAÇÃO DO MANEJO REPRODUTIVO”

Bicudo, S.D.; Sousa, D.B.; Takada, L.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Campus de Botucatu - S.P.

Contato: sony@fmvz.unesp.br

Resumo: Objetiva-se apresentar as possibilidades e limitações do emprego de sêmen refrigerado em ovinos, bem como um breve apanhado fisiológico da reprodução da fêmea ovina, que serve como embasamento a aplicação das biotécnicas utilizadas na intensificação do manejo reprodutivo.

Palavras-chave: ovino, inseminação artificial, sêmen refrigerados.

Summary: The present relate was done to present the possibilities and limitations of the chilled ovine semen, as well as a brief physiologic review of the ovine female reproduction, that serves as abasement to application of the biotechnology reproduction, witch is used in the intensification of the reproductive handling.

Key-words: sheep, artificial insemination, chilled semen.

1. Introdução

Dentre as biotécnicas da reprodução, a inseminação artificial (IA) é aquela que propicia maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento animal. A adequada seleção dos atributos produtivos e reprodutivos de machos e fêmeas é a base essencial para a maximização do potencial dessa técnica como ferramenta de melhoramento. Entretanto, além dessa característica primordial, a IA pode e deve ser empregada como instrumental na intensificação do manejo reprodutivo.

Estes dois conceitos (melhoramento e intensificação de manejo) devem ser indissociáveis, e encontram na espécie ovina uma condição favorável a sua implantação. Por princípio a espécie ovina é precoce em seus aspectos produtivos e reprodutivos, e alia-se a isto um ciclo biológico curto, no qual se destaca um intervalo entre gerações bastante breve. Desse fato, decorre a necessidade de uma constante renovação de reprodutores para se evitar com a intensificação do manejo reprodutivo, a nociva intensificação da consangüinidade.

Outra característica favorável à precocidade ovina é o fato do ciclo estral ser de aproximadamente 16 dias. Como consequência é possível a utilização de estações de monta de 60 dias quando são oferecidas praticamente 4 chances de cobertura a uma fêmea. É desejável a associação da IA a programas de sincronização/indução de estro (efeito macho ou métodos fármaco-hormonais) no início da estação de cobertura, e repasse com monta natural. Com isso, tem-se um a antecipação e agrupamento das coberturas e partos com uma otimização do uso dos carneiros. Portanto, a IA pode ser uma das estratégias chaves na intensificação do manejo reprodutivo.

A utilização do sêmen congelado em programas de IA, deve ser a aspiração de uma propriedade com adequado desenvolvimento tecnológico, por todas as vantagens inerentes a esta modalidade. Devido às dificuldades que se encontra na transposição cervical da ovelha mesmo durante o estro, bons resultados de concepção na IA sêmen congelado/descongelado somente são alcançados promovendo-se a deposição do sêmen intra-uterinamente, que deve ser feita com o emprego da laparoscopia. A técnica de laparoscopia embora não represente um obstáculo absoluto, constitui-se em um empecilho a popularização da IA com sêmen congelado, visto que requer mão de obra bastante qualificada e disponibilidade de laparoscópio, equipamento de custo moderadamente elevado e de emprego limitado. A escala de utilização deve nortear a decisão pessoal do profissional liberal em oferecer tal serviço e o módulo quantitativo (número de ovelhas a serem inseminadas) deve servir de parâmetro a uma empresa que pretenda investir nessa biotécnica, sendo que, é necessário investimento inicial em qualificação pessoal e na aquisição de equipamentos em ambos os casos.

As modalidades de IA utilizando-se sêmen a fresco e refrigerado, embora de menor impacto sobre o melhoramento do rebanho, requer menor sofisticação em sua aplicação, tendo potencialmente melhores chances em sua popularização. A questão central talvez não seja definir-se *a priori* qual das modalidades é a melhor, mas sim qual delas é a ideal para ser implementada, respeitando-se o estágio de desenvolvimento tecnológico da propriedade. Torna-se importante conhecer e bem cada uma das ferramentas, adequadas para cada caso em particular.

2. Inseminação ovina com sêmen refrigerado

2.1. Meios diluidores:

Embora existam relatos históricos sobre a possibilidade de ser preservado o material seminal por longo tempo em sua forma líquida e à temperatura ambiente, utilizando-se diluidores gaseificados (Foot et al., 1958) ou adicionados de anti-oxidantes (Upreti et al, 1997) , a possibilidade mais factível é a refrigeração em temperaturas na faixa de 10 a 15°C (Chang & Walton 1940) ou 0 a 5°C (Salamon & Maxwell (2000). Há sempre a preocupação do resfriamento do sêmen ser gradativo até se atingir a temperatura desejada (Bicudo et al., 1991; Paganini Filho et al., 1997; Sousa & Bicudo, 2002).

Segundo Evans & Maxwell (1987), Maxwell & Salamon (1993), Salamon & Maxwell (1995) e Salamon & Maxwell (2000) entre a faixa de 20°C e 0°C, há maior susceptibilidade das células espermáticas ao choque térmico, causador de mudanças irreversíveis aos espermatozoides. Neste

sentido os meios diluidores exercem papel fundamental na preservação do sêmen, quer no processo de refrigeração ou congelação, além do papel de expansor do volume seminal, permitindo seu fracionamento.

Os diluidores que demonstraram inequívoca eficácia tem em sua composição um sistema tampão (citrato, tris, Tes Hepes, Mop, Mes, Pipes); um fator protéico de crioproteção (a base de gema de ovo ou leite); diversos açúcares (monossacarídeos - glicose, manose, frutose; dissacarídeos – sacarose, lactose) e diversos aditivos a exemplo dos antioxidantes e glicina (Salamon & Maxwell, 2000).

Como recomendação prática e para ilustrar a possibilidade de uso de alguns meios diluidores, dentre as diversas classes existentes, apontam-se as formulações recomendadas por Evans & Maxwell (1987) a base de Tris-gema (Tris); por Cortell (1973) a base de leite desnatado e glicose (GL); e por Gonzáles et al. (1996) a base de Glicina-gema-leite (GGL).

Paganini Filho et al. (1997) e Paganini Filho (1999) demonstraram *in vitro* a superioridade da fração I (sem glicerol) do GGL proposto por Gonzales (1996) e Gonzales et al. (1996) na refrigeração do sêmen ovino em geladeira. Sousa (2002) e Souza e Bicudo (2002) comprovaram os relatos daqueles autores e demonstraram maior eficiência do meio GGL em preservar o sêmen ovino refrigerado no sistema Equitainer®¹.

Diluidores a base de água de coco (*Cocus muciferas*) tem sido amplamente estudados e utilizados no nordeste brasileiro e com magnífica eficácia devido sua eficiência e baixo custo (Nunes, 1998). Apresenta como principal restrição a necessidade de se utilizar a solução proveniente de frutos frescos e em um bem definido estadio de maturação, o que limita as possibilidades de uso a regiões produtoras de coco.

2.2. Proporção de diluição:

O volume inseminante é o fator inicial a ser considerado e juntamente com as características do ejaculado (volume, motilidade e concentração espermáticas) desencadeiam um processo que resulta na taxa de diluição a ser empregada.

Carneiros com baixos volume ejaculado e concentração espermática, não propiciam a adição de diluidor suficiente para uma adequada refrigeração, a menos que o volume inseminante seja aumentado, com todos os inconvenientes que podem advir.

A finalidade primordial da adição de meios diluidores ao sêmen é a de conferir proteção aos espermatozoides que serão submetidos ao processo de refrigeração. Diluições em que o meio seja adicionado em proporção menor que o volume de sêmen pode não atingir os efeitos de crioproteção desejados.

2.3. Volume inseminante:

Na técnica de inseminação cervical superficial, que é a que melhor se adequa a proposta de simplificação conferida pelo emprego de sêmen a fresco ou refrigerado, deve-se ter preocupação com a ocorrência de refluxo após a deposição do sêmen. Volumes superiores a 0,25 mL mormente com baixa viscosidade devido a baixa concentração espermática, tendem a não permanecer no local de deposição, refluindo em grande parte para a porção mais caudal da vagina. O meio diluidor empregado em proporções acima de 1:2 (v:v) tendem a promover este mesmo efeito. De modo ideal, deve-se usar em cada ovelha um volume de 0,1 mL de um sêmen com alta concentração espermática e diluído na proporção de 1:1 (v:v). Nesta situação metade do volume inseminante será constituído pelo sêmen e a outra metade pelo meio.

Conclui-se, pois que a decisão de se utilizar uma determinada taxa de diluição é o ponto crítico desse processo e deve-se considerar que para um sêmen com concentração entre 3 e 4x10⁶xmm⁻³, diluído 1:1 (v:v) em que se empregue volume inseminante de 0,1 mL, o número de espermatozoides na dose será de 150 a 200x10⁶. O número de ovelhas a serem inseminadas, nesta circunstância, estaria em função do volume ejaculado e em se considerando 1 mL como padrão esperado, resultaria em material suficiente para 20 ovelhas.

Torna-se desejável empregar-se carneiros com concentração espermática superior a estas, permitindo praticar taxas mais elevadas de diluição (1:2 a 1:4 v:v) ou doses inseminantes com um maior número de espermatozoides.

2.4. Número de espermatozoides na dose inseminante:

Husein et al. (1998) conceituam que as inseminações devem ser feitas com alto número de espermatozoides visando atingir-se taxas elevadas de concepção. O número de espermatozoides a serem depositados na técnica de inseminação cervical superficial com sêmen a fresco ou refrigerado, tem sido extremamente variável segundo revisão de Maxwell & Salamon (1993) que apontam valores entre 25 e 500 milhões de espermatozoides por dose inseminante. Esses autores relataram resultados de fertilidade entre 50% e 75%, considerados satisfatórios, com o uso de 250 a 500 milhões de espermatozoides refrigerados por 8 a 12 horas a 15oC, e 30% e 32% quando utilizou doses de 25 a 100 x 10⁶ espermatozoides refrigerados a 5°C durante 5 e 18 horas, respectivamente.

Sousa (2002), utilizando dose inseminante entre 150 e 200 milhões de espermatozoides, obteve taxa médias de prenhez de 41,9% com sêmen fresco e 21,5% com sêmen refrigerado a 5°C em ovelhas

¹ Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA

com estro sincronizado. Quando as inseminações foram realizadas em ovelhas em estro natural e empregando-se 100 milhões de espermatozoides, as taxas foram de 78,6% para o sêmen a fresco e 71,4% para o sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C.

Há, portanto evidências de que exista um efeito de interação entre a modalidade de processamento do sêmen (a fresco ou resfriado) com a condição estral da ovelha (estro natural ou induzido) que suplanta o efeito do uso de quantidades inferiores de espermatozoides (150 a 200 milhões v.s. 100 milhões) na dose inseminante.

A rigor, diversos fatores interagem para compor o resultado final, sendo importante não subestimar nenhuma das variáveis.

2.5. Tempo e métodos de refrigeração:

Para Colas & Courot (1976), pode-se conservar o sêmen ovino refrigerado e com capacidade fertilizante somente por um período inferior a 24 horas. Robertson & Watson (1987) verificaram redução na motilidade espermática entre 24 e 48 horas de armazenamento.

Maxwell & Salamon, (1993) verificaram resultados desfavoráveis ao correlacionarem o tempo de refrigeração do sêmen e a taxa de fertilidade e Maxwell & Watson (1996) citaram a ocorrência da redução da fertilidade com sêmen armazenado por período superior a 24 horas e depositado por via cervical.

Avaliações *In vitro* feitas por Paganini Filho et al., (1997) revelaram uma alta capacidade de manutenção das células espermáticas por até 48 horas de refrigeração a 5°C. Sousa & Bicudo (2002), empregando sistema controlado de refrigeração, o container Equitainer®, realizaram análises computadorizada da motilidade e de microscopia epifluorescente para avaliação das membranas espermáticas e teste de exaustão demonstraram haver alta capacidade de manutenção das células espermáticas ovinas por períodos de refrigeração de 24 e 48 horas.

2.4. Técnicas de inseminação:

Maxwell & Watson (1996), Ghalsasi & Nimbkar (1996) e Naqvi et al., (1998), Yoshida (2000) relataram uma limitação na inseminação artificial em ovinos com sêmen congelado devido à baixa fertilidade com o uso da técnica cervical. Bunch & Ellsworth (1981) e Naqvi et al., (2001) atribuíram este fato à complexidade da anatomia cervical da ovelha devido às pregas cartilaginosas serem dispostas em diferentes planos e posições, dificultando a inseminação. Visser (1974) relatou a dificuldade do transporte espermático pelo genital da ovelha e Gustafsson (1978) citou como sendo esta a principal causa da baixa fertilidade com o uso da inseminação com sêmen congelado.

Inequivocamente a técnica de inseminação artificial laparoscópica é a que oferece melhores resultados de concepção em ovinos (Salamon & Maxwell, 2000).

Considerando-se as técnicas de inseminação artificial transcervical ou cervical superficial o sêmen refrigerado tem como vantagem obter-se índices de concepção próximos aos alcançados com sêmen fresco (López et al. 1999; Sousa, 2002, Sousa & Bicudo, 2003), além de serem técnicas menos complexas, mais baratas e acessíveis.

O momento de ovulação tem variado dentro e entre os rebanhos de ovelhas com estro sincronizado, afetando diretamente a eficiência dos programas de inseminação artificial com tempo pré-determinado. O tempo entre a retirada da esponja e o início do estro é determinado pelo tipo de esponja empregada e também por outros fatores como a estação do ano, a idade do animal, estado nutricional, lactação, tipo de progesterona, uso de eCG, entre outros (Romano et al., 2001).

Para Evans & Maxwell, (1987), a inseminação artificial cervical com tempo pré-determinado deve ser realizada dentro de 48 a 58 horas após a remoção da esponja, sendo geralmente única ao redor das 55 horas. Em alguns relatos, a IA com tempo pré-determinado com sêmen refrigerado produz melhor resultados às 60 horas do que às 48 horas, entretanto outros autores não descrevem esta diferença (Romano et al., 1996).

Sousa (2002) optou pela inseminação no tempo de 56 horas após a retirada das esponjas para cruzamentos e animais Suffolk. Contudo, frente aos resultados, suspeitou que o momento preconizado para as inseminações artificiais não tenha sido ideal (sêmen a fresco 41,9% vs sêmen refrigerado 21,5%).

Segundo Romano et al., (2000) e Romano et al., (2001), a presença do macho não só reduz o tempo entre a retirada da esponja e o início do estro, ocorrendo picos de LH entre 24 e 48 horas após a remoção da esponja e reduz ainda a variação do início do estro, estando a maioria das ovelhas no melhor estágio do estro para a inseminação artificial após 42 a 52 horas da retirada das esponjas.

3. Considerações sobre a fisiologia da reprodução em ovinos

A atividade reprodutiva é a expressão fisiológica de um conjunto complexo de mecanismos e fenômenos que obedecem a rígido controle endógeno de um sistema hierarquizado de órgãos que se inter-relacionam, utilizando avançada linguagem bioquímica. A compreensão desse universo ainda é restrita, porém nos últimos anos a velocidade da aquisição de conhecimento se acelerou e como consequência as biotécnicas aplicáveis à reprodução sofrerão evolução e se diversificaram (Bicudo, 1999) A influência do ambiente sobre o organismo nele inserido é um fenômeno em constante modificação e adaptação. Um dos mecanismos adaptativos constitui-se a estacionalidade reprodutiva, que permite às espécies gerar crias em momentos de maior probabilidade de sobrevivência, quer pela adequação climática-ambiental, quer pela disponibilidade de alimentos (Bicudo, 1999).

A reprodução na espécie ovina apresenta diversas particularidades entre elas o fato da ovelha apresentar gestação de cinco meses, sendo possível o acasalamento de animais entre o primeiro e segundo ano de vida. Além disso, a maioria das raças ovinas apresenta estacionalidade reprodutiva com a concentração das ocorrências deaios no final de verão e durante o outono. A temporada de nascimento usualmente ocorre nos meses de inverno ou início da primavera. Os ovinos apresentam um ciclo curto de produção, com a possibilidade de cordeiros serem abatidos em seu primeiro ano de vida. (Bicudo, 2002).

O ovino tem sua reprodução favorecida no final do verão e início do outono, quando da diminuição estacional do fotoperíodo (Setchell, 1992). Somando-se o período de gestação ao da época de acasalamento, há ocorrência dos partos coincidentemente com a primavera. Entretanto, a domesticação, a pressão adaptativa e a distribuição cosmopolita das raças fizeram com que muitos grupos raciais ampliassem o período de atividade reprodutiva, havendo casos em que a estacionalidade praticamente inexistente.

Rodrigues, (2001) em estudos avaliando a sazonalidade reprodutiva em ovelhas conceitua a duração da estação reprodutiva como período entre o primeiro e último estro observado, e o período de anestro como o intervalo de tempo entre o último e o primeiro estro da próxima estação reprodutiva. Em altas latitudes a estação reprodutiva está estreitamente relacionada ao fotoperíodo, enquanto em baixas latitudes está relação é menos acentuada.

Dentre os fatores ambientais, a luminosidade é tida como preponderante na regulação da estacionalidade reprodutiva do ovino. A pineal é apontada como o elo de ligação de um complexo mecanismo que tem seu início na estimulação do nervo óptico e que culmina pela maior ou menor prevalência na liberação de melatonina (Karsch, 1984).

A liberação de melatonina obedece a um rígido padrão, onde a obscuridade é seu principal fator de estímulo, regulado, no entanto por sinais provenientes do sistema nervoso central, tidos como relógio biológico endógeno. A melatonina atuando nos centros hipotalâmicos, determina o padrão de resposta dos centros de liberação tônica e pré-ovulatórias de hormônio liberador de gonadotrofina - GnRH (Hafez, 1993; Lincoln, 1992). Da modulação da sensibilidade do centro tônico de liberação de GnRH aos esteróides gonadais, é que decorre a manifestação dos fenômenos cíclicos de reprodução no ovino (Hafez, 1993).

Durante a estação de anestro os centros hipotalâmicos de liberação tônica de GnRH apresentam extrema sensibilidade ao controle retrógrado negativo exercido pelo estrógeno. Dessa forma são mantidos pulsos de LH de baixas frequência e amplitude, resultando em baixa atividade ovariana, suficiente apenas para produção de quantidades de estrógeno (E2) a níveis de promover a repressão do centro tônico de liberação de GnRH.

Próximo do final do anestro estacional, a atividade dos mecanismos inibitórios sobre a frequência e amplitude dos pulsos de LH esta diminuída (Karsch, 1984). Por hipótese a prevalência temporal de liberação da melatonina é o modulador nesse processo, tornando os centros hipotalâmicos de liberação tônica de GnRH menos sensível ao controle retrógrado negativo exercido pelo E2, restaurando progressivamente os padrões de secreção de LH, com conseqüente estimulação da produção de estrógeno pelos folículos ovarianos.

Quando níveis de E2 atingem o limiar estimulatório dos centros pré-ovulatórios de LH ocorre um bem marcado pico de liberação desse hormônio que promoverá a ovulação dos folículos que estejam suficientemente desenvolvidos.

Tem se sugerido que quando o primeiro pico pré-ovulatório de LH é induzido, os grandes folículos nem sempre estão maduros a ponto de desenvolver um corpo lúteo (CL) normal (Hunter, 1991). Durante a transição da estação reprodutiva em ovelhas, tem-se observado uma curta fase luteal com secreção de progesterona, podendo ser resultado de uma ovulação de um folículo antral prematuro, entretanto, o aumento das concentrações de progesterona durante a transição para a atividade reprodutiva em ovelhas pode ter um papel importante para o padrão de desenvolvimento do folículo antral que resultara na primeira ovulação (Legan et al., 1985), e na sensibilização cerebral para a manifestação do primeiro estro da estação.

Secreções de FSH sofre menos mudanças estacionais do que a liberação de LH (Karsch, 1984). As concentrações de FSH estão relacionadas com a emergência de um folículo ovulatório antral, durante (Ginther et al., 1985; Bartlewski et al., 1999) e fora da estação reprodutiva (Bartlewski et al., 1998).

Os ovários têm sido examinados por ultra-sonografia (US) com sucesso usando transdutor linear rígido 7,5 MHz transretal desenvolvido para exames de próstata em humanos. Assim permitindo o estudo de estruturas ovarianas, dinâmica folicular e a formação do CL (Ravindra & Rawlings, 1997).

O uso de US, em ovelhas com ovários cirurgicamente transplantados (Souza et al., 1996) e em ovários intactos (Ravindra & Rawlings, 1997; Ginther & Wiltbank, 1995; Rubianes 2000) permitiu monitoramento do desenvolvimento do folículo ovariano antral e a função do corpo lúteo sem estressar o animal.

Em pequenos ruminantes o desenvolvimento folicular ocorre em ondas tanto na estação reprodutiva (Ginther & Wiltbank, 1995) como durante o anestro estacional (Souza et al., 1996; Bartlewski et al., 1998), elas emergem com intervalos de 4-6 dias. Os esteróides ovarianos interagem com as gonadotrofinas para regular a dinâmica folicular. A emergência da onda é determinada pelo aumento de FSH observando-se 1 a 2 dias antes de cada onda.

A utilização diária da endoscopia (Noel et al., 1995) ou da ultra-sonografia transretal de ovários (Ginther & Wiltbank, 1995; Bartlewski et al., 1998), durante o ciclo estral de ovelhas, proporcionou o

estudo do crescimento do folículo antral ovariano, diâmetro do folículo ovulatório, e o padrão de ondas foliculares. Algumas ovelhas apresentam três ou quatro ondas foliculares definido pelo crescimento do folículo excedendo 5 mm de diâmetro por intervalo interovulatório.

Eventos foliculares como recrutamento, seleção e dominância foram descritas em vacas (Adams, 1993), mas em ovelhas existem poucos relatos devido as dificuldades de acesso anatômicas e a pequena diferença de tamanho entre o folículo dominante e o subordinado (Rubianes, 2000).

Existem fortes evidências experimentais que indicam que durante a primeira e a última (ovulatória) onda folicular ocorre um mecanismo denominado dominância. Um folículo de um pool de recrutados é selecionado, ele continua crescendo enquanto os outros entram em atresia. O folículo dominante na sua fase final de crescimento dependente da pulsabilidade de LH (Baird & McNeilly, 1981). O folículo maior de uma onda será o folículo ovulatório se conseguir estabelecer uma cascata endócrina com o LH que resulte em um pico pré-ovulatório de LH. Há opiniões divergentes entre os autores, sobre a existência da dominância nas ondas intermediárias do ciclo estral das ovelhas (Rubianes, 2000).

Estudos da ultra-sonografia em ovelhas durante o anestro (Souza et al., 1996; Ravindra & Rawlings, 1997; Bartlewski et al., 1998) demonstraram um padrão cíclico de crescimento folicular e atresia similar ao que ocorre durante a estação reprodutiva com emergência da onda folicular associada à ocorrência de flutuações de concentrações plasmáticas de FSH. Os folículos durante o anestro podem atingir tamanho pré-ovulatório, mas entram em atresia (Bartlewski et al., 1998).

4. A indução/sincronização do estro como ferramenta para intensificação do manejo reprodutivo.

A sincronização do estro em ovelhas visando a desestacionalização da atividade reprodutiva ou a intensificação do manejo é de grande interesse e indispensável na utilização da inseminação artificial em momento prefixado, com ou sem a observação das manifestações estrais (Moraes et al., 2002). A prostaglandina e seus análogos preconizados por Houghton et al. (1995) pode ser empregados em doses menores as de uso rotineiro (Chagas, et al., 1994) ou esporadicamente em associação ao GnRH (Quirke, et al. 1979; Rubianes, 2000). No entanto, a progesterona e progestágenos são os fármacos mais amplamente empregados nos programas de sincronização do estro ovino (Godfrey et al., 1997; Rubianes, 2000) e, na maioria das vezes, associados ao eCG (Leyva et al. 1998; Vifioles et al., 2001) e menos frequentemente ao GnRH (Salamon & Maxwell, 2000).

Além de permitir a implementação das diversas biotécnicas da reprodução, deve-se considerar ainda, que na dependência dos objetivos da indução/sincronização do estro, um agrupamento dos trabalhos de I.A. ou cobertura em alguns dias, pode ser de grande valia no agrupamento dos partos, com conseqüente formação de lotes homogêneos de cordeiros para a comercialização, (Godfrey et al., 1997).

4.1. Efeito Macho

Durante a estação reprodutiva ou próxima ao seu início, em uma determinada raça é possível empregar apenas o método natural que é chamado efeito macho ou efeito carneiro. Após o isolamento das ovelhas em anestro do contato com carneiros, quando da reintrodução dos machos no rebanho, as fêmeas ovulam em um período de 24 a 60 horas. Esse procedimento é muito utilizado quando se deseja antecipar a manifestação de estro em torno de um mês antes do início efetivo da estação reprodutiva (Moraes et al., 2002).

4.2. Prostaglandina $F_{2\alpha}$ e seus análogos sintéticos

Sua eficácia depende da funcionalidade do corpo lúteo, sendo mais eficaz nos dias 5 a 14 do ciclo estral. Quando se administra uma aplicação de prostaglandina a porcentagem de animais que apresentam manifestações de estro dentro de 3 a 4 dias é de 60-70%. Já quando são realizadas duas aplicações com intervalo de 9 a 12 dias, 100% dos animais apresentam estro. O intervalo entre a administração da $PGF_{2\alpha}$ e o início do estro tem sido bastante variado, devido ao estágio de desenvolvimento folicular de quando a luteólise é induzida (Rubianes et al., 2000).

4.3 Progestágenos

A precisa sincronização do ciclo estral em ovelhas ou a indução do estro em ovelhas em anestro estacional tem sido realizada com o uso de esponjas intravaginal impregnada com progestágenos (acetato de medroxiprogesterona MAP, acetato de fluorogestona, FGA ou acetato de melengestrol MGA) por 12 a 14 dias, seguido de gonadotrofina sérica de égua prenha (PMSG - eCG) (Boland et al., 1981; Smith et al., 1981). Contudo, a fertilidade do tratamento com progestágenos em ovelhas em anestro tem sido variável atingindo 22 a 70%. Esta variação é atribuída a diversos fatores incluindo regime de tratamento, início do tratamento no estágio de anestro, manejo da ovelha, nutrição, lactação, mudanças estacionais da fertilidade do carneiro, tempo de inseminação combinados com todos fatores acima (Romano et al., 1996). A combinação de progestágenos com eCG também é utilizada durante a estação reprodutiva principalmente quando se procura aumentar a taxa ovulatória (Rubianes, 2000).

Takada et al., 2003 estudaram o momento ovulatório através de ultra-sonografia do ciclo estral durante a pré-estação reprodutiva na região de Botucatu em 12 ovelhas da raça Suffolk utilizando MAP + eCG, onde observaram que 100 % das ovelhas ovularam entre 50 e 67 h, com concentrações das ovulações entre 60-67h (9/12).

Outro tipo de dispositivo encontrado no mercado é o CIDR um dispositivo intravaginal liberador de progesterona para uso em pequenos ruminantes com custo superior ao da esponja. Apresentando

menos vaginite do que as esponjas. Com o termino do tratamento de curta duração pode ser reutilizado após a higienização (Rubianes, 2000).

Bicudo & Souza, em ovelhas cruza Ile de France induzidas ao estro com CIDR®/eCG, concluíram que a taxa de concepção no estro induzido ou no primeiro estro natural após o da indução/sincronização é semelhante, independente da utilização de sêmen a fresco ou refrigerado à 5°C por 24 horas que para o estro induzido/sincronizado, a taxa de concepção é influenciada pelo meio diluidor a ser utilizado no processo de refrigeração.

4.4. Protocolos de curta duração

Uma menor fertilidade tem sido observada quando se utilizam protocolos tradicionais longos com progestágenos, umas das prováveis causas seria baixos níveis hormonais no final do tratamento. Prolongando a vida do folículo pré-ovulatório, provocando alterações no ovócito ovulado.

Ungerfeld & Rubianes, (1999) avaliaram a eficácia dos tratamentos de curta duração e de longa duração (tradicionais) com esponjas de MAP por 6, 9 e 12 dias com administração de eCG, durante o anestro estacional. Tratamentos com esponjas por 6 dias apresentaram resultados tão bons como os tratamentos de 9 e 13 dias, concluindo que os tratamento de curta duração podem ser utilizados para indução do estro em ovelhas.

Bicudo e Sousa, (2003), propuseram protocolo de curta duração (seis dias) aplicando-se prostaglandina e eCG dois dias antes da retirada da esponja e constataram menor dispersão de ocorrência do estro, quando comparado a protocolo de 12 dias. Concluíram que o protocolo proposto foi eficaz na indução/sincronização do estro de ovelhas Suffolk durante a estação de reprodução, com a totalidade delas manifestando estro em até 72 horas após a retirada da esponja.

4.5. Controle do ciclo estral com sincronização da ovulação

A sincronização da ovulação tem como objetivo a inseminação em horário pré-determinado.

Um dos métodos utilizados em bovinos é a associação de progestágenos com estrógenos para sincronização da onda folicular, e consequentemente do momento ovulatório.

Takada et al., (2003) utilizaram em 12 ovelhas da raça Suffolk durante a pré-estação reprodutiva MAP (medroxiprogesterona), benzoato de estradiol e GnRH, onde observaram que 91,7 % dos animais ovularam entre 52 e 82 h (11/12), apresentando uma concentração entre 60 e 68 h (6/12).

5. Considerações finais

A inseminação artificial em ovinos utilizando-se sêmen refrigerado, apesar de suas limitações, pode constituir-se em um excelente instrumental de intensificação do manejo reprodutivo, por permitir o uso abrangente e racional de carneiros de alto potencial produtivo. A potencialização dessa pode ser alcançada quando praticada em associação a programas de indução/sincronização do estro e ao diagnóstico precoce da gestação com o emprego de ultra-sonografia modo B.

6. Referencias Bibliográficas

- ADAMS, G.P., KO, J.C.H., SMITH, C.A., GINTHER, O.J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 73, 267-275, 1993.
- BAIRD, D.T. 1981. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrus cycle of the ewe. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 30, 119-133, 1981.
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, AP, COOK, SJ CHANDOLIN,RK., HONARAMOOZ, A, RAWLINGS, NC., Ovarian antral; follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrus cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J.Reprod. Fertil.*, v. 115, 111-124, 1999.
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, AP, COOK, SJ, RAWLINGS, N.C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 113, 275-285, 1998.
- BICUDO, S. D. *Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima.* Botucatu, 1999, 107p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- BICUDO, S. D. Sumário das pesquisas em reprodução ovina desenvolvidas na FMVZ UNESP Botucatu. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINO CULTURA, 6, 2002, Botucatu, SP. *Anais...Botucatu: FMVZ-UNESP.* 2002.
- BICUDO, S. D., PAGANINI FILHO, P., SOUZA, M. I. L., SOUSA, D. B. O. Taxa de concepção no estro induzido com CIDR®/eCG e no estro natural pós-sincronização em programa de inseminação artificial de ovelhas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, p. 171-4, 2002.
- BICUDO, S. D., PASCHOAL, J. P. S., RIBEIRO, E. F. R., PAPA, F. O. Dispositivo de incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, supl. 2, p. 456, 1991.
- BICUDO, S. D., SOUSA, D. B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas. In: MOSTRA CIENTÍFICA DA FMVZ DA UNESP, 6, 2002, Botucatu, SP. *Anais... Botucatu: FMVZ-UNESP.* 2002.
- BICUDO, S.D. & SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas suffolk. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto Seguro – BA. *Anais... Belo Horizonte - MG: CBRA,* 2003.

- BICUDO, S.D., PAGANINI FILHO, P., SOUZA, M.I.L., SOUSA, D.B. Taxa de concepção no estro induzido com CIDR®/eCG e no estro natural pós-indução/sincronização em programa de inseminação artificial de ovelhas. *Ver. Brás. de Reprod. Anim.* v.26, n.3, p.171-4, 2002.
- BOLAND, MP., CROSBY, TF., GORDON, I. Induction of pregnancy in lactating anoestus ewes. *J.Agric. Sci. (Camb)*, v. 97, 465-467, 1981.
- BUNCH, T. D., ELLSWORTH, H.S. Gross anatomy of the ovine cervix. *Int. Goat Sheep Res.*, v.4, p. 282-5, 1981.
- CHAGAS, L.M., SOUZA, C.J.H., MOURA, A., MORAES, J.C.F. Viabilidade do emprego de uma minidose de prostaglandina na sincronização deaios em ovinos. *Ciência Rural*, v. 24, p.355-338, 1994.
- CHANG, M.C., WALTON, A. The effects of low temperature and acclimatization on respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proc. R. Soc. B* 129, p.1531-3, 1940.
- COLAS, G., COUROT, M. Storage of ram semen. In: TOMAS, G. J., ROBERTSON, D. E., LIGHTFOOT, R. J. *Sheep breeding*. 2 ed., London: Butterworths, 1976, p. 521-32.
- CORTEEL, J. M. L'Insemination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. *World Rev. Anim. Prod.* v. 9, p. 73-99, 1973.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney, Butterworths, 1987, p.194.
- GHALSASI, P. M., NIMBKAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. *Small Ruminant Res.*, v. 23, p. 69-73, 1996.
- GINTHER, OJ., KOT, K., WILTBANK, MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the oestrus cycle in ewes. *Theriogenology*, v. 43, 689-703, 1995.
- GODFREY, R.W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of oestrus synchronization of hair sheep in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.* v.47, p.99-106, 1997.
- GONZALEZ, C. I. M. *Avaliação in vitro e in vivo de sêmen ovino (Ovis aries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores*. Botucatu, 1996, 134p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal - Universidade Estadual Paulista).
- GONZALEZ, C. I. M., OBA, E., BICUDO, S. D., SOUZA, M. I. L. Cryopreservation of semen in Ideal rams with glycine-egg yolk-extender. In: International Congress of Animal Reproduction, 13, 1996, Sydney. *Proceedings...* Sidney, 1996. p. 2-9.
- GUSTAFSSON, B. K. Aspects of fertility with frozen thawed ram semen. *Cryobiology*, v. 15, p. 358-61, 1978.
- HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animal*, 6th ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993, 573p.
- HOUGHTON, J.A.S., LIBERATI, N., SCHRICK, F.N., et al. Day of estrous cycles affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J. Anim. Sci.* v.73, p.2094-2101, 1995.
- HUNTER, M.G. Characteristics and causes of inadequate corpus luteum. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*, 43, 91-99, 1991.
- HUSEIN, M. Q., BAILEY, M. T., ABABNEH, M. M., ROMANO, J. E., CRABO, B. G., WHEATON, J. E. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology*, v. 49, p. 997-1005, 1998.
- KARSCH, F.J. Endocrine and environmental control of oestrous cyclicity in sheep. In: LINDSAY, R.D., PEARCE, D.T. *Reproduction in sheep*. Sidney: Aust. Acad. Sci., 1984, p.10-5.
- LEGAN, S.J., I ANSON, H., FITZGERALD, B.P., AKAYDIN, M.S., Jr. Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycle in anestrus ewe. *Endocrinology*, 117, 1530-1536, 1985.
- LINCOLN, G.A. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. In: DIELEMAN, S.J., COLENBRANDER, B., BOOMAN, P., VAN DER LENDE, T. *Clinic trends and basic research in animal reproduction*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.203-17.
- LÓPEZ, A., SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Vet. Scand.*, v. 40, p. 1-9, 1999.
- MAXWELL, W. M. C., SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 5, p. 613-38, 1993.
- MAXWELL, W. M. C., WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MORAES, J.C.F., SOUZA, C.J.H., GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. IN: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Varela, São Paulo, 2002, p.25-55.
- NAQVI, S. M. K., JOSHI, A., BAG, S., PAREEK, S. R., MITTAL, J. P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. Technical note. *Small Ruminant Res.*, v. 29, p. 329-33, 1998.
- NAQVI, S. M. K., JOSHI, A., DAS, G. K., MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Res.*, v. 39, p. 199-208, 2001.
- NOEL, B., BISTER, J.L. PAQUAY, R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fertil.*, v. 99, 695-700, 1995.
- NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais e do homem. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.22, n.2, p.109-12, 1998.

- PAGANINI FILHO, P. BICUDO, S. D., SOUZA, M. I. L., SOUSA, D. B. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, p.61-2, 1997.
- PAGANINI FILHO, P. Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração. Botucatu, 1999. *Dissertação* (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- QUIRKE, J.R., JENNINGS, J.J., HANRAHAN, J.P., et al. Oestrus, time of ovulation, ovulation rate and conception rate in progestagen-treated ewes given GnRH, GnRH- analogues and gonadotrophin. *J.Reprod. Fertil.*, v. 56, p.479-488, 1979.
- RAVINDRA & RAWLINGS, N.C. Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *J. Reprod. Fertil.*, v. 110, p. 279-289, 1997.
- ROBERTSON, L., WATSON, P. F. The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5° C. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 15, n. 3-4, p. 177-87, 1987.
- RODRIGUES, P.A. *Avaliação da sazonalidade reprodutiva e perfil secretório de melatonina em ovelhas (ovis aries) das raças Romney Marsh, Suffolk e Santa Inês*. Tese (doutoramento)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- ROMANO, J. E., CHRISTIANS, C. J., CRABO, B. G. Continuous presence rams hastens the onset of estrus in ewes synchronized during the breeding season. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v. 66, p. 65-70, 2000.
- ROMANO, J. E., FERNANDEZ ABELLA, D., VILLEGAS, N. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v. 73, p. 193-8, 2001.
- ROMANO, J.E., RODAS, E., FERRREIRA, A., LAGO, I., BENECH, A. Effects of progestagen, PMSG and artificial insemination time on fertility and prolificacy in Corriedale ewes. *Small Rumin. Res.*, v. 23, 157-162; 1996.
- RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reprodutiva em cabras y ovejas. IN: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000. São Paulo - SP *Anais...* São Paulo - SP: FMVZ-USP. 2000.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62. p. 77-111, 2000.
- SETCHELL, B.P. Domestication and reproduction. In: DIELEMAN, S.J., COLENBRANDER, B., BOOMAN, P., VAN DER LENDE, T. *Clinic trends and basic research in animal reproduction*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.195-202.
- SMITH, P.A., BOLAND, M.P. GORDON, I. Effect of type of intravaginal progestagen on the outcome of fixed-time artificial insemination. *J. Agric. Sci. (Camb)*, v. 96, 243-245; 1981.
- SOUZA, D. B. *Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial*. Botucatu, 2002. 103p. *Dissertação* (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.
- SOUZA, D. B., BICUDO, S. D. Desempenho do Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, n. 3, p. 166-8, 2002.
- SOUZA, C.J.H., CAMPBELL, B.K., BAIRD, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J.Reprod. Fertil.*, v. 108, 101-106, 1996.
- Takada, L., Bicudo, S.D., Rodrigues, C.F. C., Lenz, F. F., Bianchini, D. Avaliação dos momentos do início do estro e da ovulação em ovelhas Suffolk submetidas a protocolo de curta duração para a sincronização do estro na pré-estação reprodutiva IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto Seguro – BA. *Anais...* Belo Horizonte - MG: CBRA, 2003.
- UNGERFELD, R. & RUBIANES, E. Estrous response to ram effect in Corriedale ewes primed with medroxyprogesterone during the breeding season. *Small Rumin. Res.*, v. 32, p.89-91, 1999.
- UPRETI, G. C., JENSEN, K., OLIVER, J. E., DUGANZICH, D.M., MUNDAY, R., SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 48, p. 269-78, 1997.
- VIÑOLES, C., FOSBERG, M., BANCHERO, G., RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.
- VISSER, D. Recent advances in the deep freeze preservation of ram semen. *J. Anim. Sci.*, v. 4, p. 275-88, 1974.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 349-55, 2000.