

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**USO DO SÊMEN OVINO CONGELADO EM INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS
CERVICAIS E FATORES QUE AFETAM A FERTILIDADE DOS REBANHOS.**

CARLOS BAYARD MARTINS PINHEIRO

**Porto Alegre
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**USO DO SÊMEN OVINO CONGELADO EM INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS
CERVICAIS E FATORES QUE AFETAM A FERTILIDADE DOS REBANHOS**

CARLOS BAYARD MARTINS PINHEIRO

Dissertação apresentada como um dos requisitos ao grau de mestre em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Ferrugem Moraes

Porto Alegre, 2009

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Área de concentração de Fisiopatologia da Reprodução
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USO DO SÊMEN OVINO CONGELADO EM INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS CERVICAIS E FATORES QUE AFETAM A FERTILIDADE DOS REBANHOS

Autor: Carlos Bayard Martins Pinheiro
Orientador: José Carlos Ferrugem Moraes

O melhoramento genético ovino carece de uma maior conexão genética entre os rebanhos, o que pode ser solucionado pelo uso mais intensivo do sêmen congelado. Entretanto, com os níveis tecnológicos atualmente disponíveis o sêmen congelado apenas pode ser empregado com eficácia diretamente no útero, dependendo de sincronização de estros e mão de obra especializada para as inseminações via laparoscopia. Uma outra alternativa é o uso de sêmen congelado com 200 milhões de espermatozóides por dose com inseminações efetuadas cerca de doze horas após a identificação do estro, preconizado para a inseminação artificial dos ovinos na Noruega pelos próprios produtores. O presente ensaio consta de uma adaptação local deste modelo com o objetivo geral de verificar a viabilidade de uso da inseminação cervical superficial com sêmen ovino congelado numa dose de 0,25 ml contendo 200×10^6 de espermatozóides em palhetas de 0,50 ml após cio natural, empregando baixo uso de insumos e mão de obra semi-qualificada. As observações foram procedidas em duas propriedades no Rio Grande do Sul, incluindo 1419 ovelhas das raças Merino, Ideal e Texel. Os resultados obtidos indicaram que as diferenças nas taxas de não retorno entre carneiros poderá ser minimizada através da utilização de outros métodos de análise e seleção de carneiros mais férteis após os procedimentos de congelamento/descongelamento, e, adicionalmente que a constatação de uma taxa de não retorno entre 25-35% nas distintas condições investigadas, permitem inferir que os sistemas investigados podem ser utilizados para interligar geneticamente rebanhos via uso de sêmen congelado.

Palavras-chave: ovelha, carneiro, inseminação artificial cervical, sêmen congelado.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Área de concentração de Fisiopatologia da Reprodução
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

EMPLOYMENT OF RAM FROZEN SEMEN IN CERVICAL SUPERFICIAL INSEMINATIONS AND FACTORS AFFECTING FLOCK FERTILITY

Autor: Carlos Bayard Martins Pinheiro
Orientador: José Carlos Ferrugem Moraes

A sheep improvement program depends on genetic connexion among flocks, which could be done by extensive use of frozen semen. However, nowadays-available technology just recommends the employment of frozen semen directly inside the uterine ambient through laparoscopy. Alternatively, there is a model recommended for Norway producers including frozen semen with 200 millions of sperms used in cervical superficial inseminations up to twelve hours from oestrus detection. The present essay is an local adaption of this system aiming to verify the viability of the employment of frozen semen for sheep reproduction in a volume of 0,25 ml, with 200×10^6 sperms in 0,50 ml straws, after natural oestrus, using low input resource and semi-qualified artificial insemination technicians. The observations were done in the two properties located at Rio Grande do Sul, including 1419 ewes from Merino, Ideal and Texel breeds. The results obtained indicate that the differences in non return rates among rams could be minimized by the employment of other methods of ram selection before the freezing procedures, and additionally the observed 25-35% non return rates in the distinct conditions investigated, permits to infer that the tested system could be useful to connect genetically the flocks using frozen semen.

Keywords: sheep, ram, cervical superficial insemination, frozen semen.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela minha família e pelos animais.

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais, Carlos (*in memoriam*) e Celanira, pela lição de vida, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Agradeço também a minha madrinha Olga (*in memoriam*) por tudo que fez desde a minha infância.

Ao Prof. Dr. José Ferrugem Moraes, que me orientou no estudo, obrigado pela paciência, otimismo e por me oportunizar um grande crescimento, tanto pessoal como profissional, ao me oportunizar realizar este trabalho.

Aos colegas e estimados amigos Adriana Pires Neves, Claudio Pimentel, Maria Carolina Canibal e Ubiratan Rezler aos quais agradeço pelas demonstrações de amizade.

Ao Cel. Antonio Paulo Alves da Silva, colega e amigo, ex-diretor da saudosa Coudelaria de Rincão, unidade do Exército Brasileiro que me proporcionou além da vivência profissional, a conquista de novas e determinantes amizades.

A todos os meus amigos, e de forma especial aos médicos veterinários, Regina Soares e Milton Silveira, pelos ensinamentos nos primeiros passos na profissão.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Por fim um agradecimento especial a minha querida esposa Adriana, parte fundamental não só neste estudo, mas fundamental na minha vida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	10
2.1	A Ovinocultura	10
2.2	A Inseminação Artificial	11
2.3	A Inseminação Artificial no Rio Grande do Sul	12
2.4	A Inseminação Artificial de ovinos com sêmen fresco e congelado	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Experimento 1	26
3.1.1	Local de Estudo.....	26
3.1.2	Animais.....	26
3.1.2.1	Carneiros.....	26
3.1.2.2	Ovelhas.....	26
3.1.2.3	Rufiões.....	27
3.1.3	Rotina das Inseminações.....	27
3.1.3.1	Apartes.....	27
3.1.3.2	Obtenção de Sêmen.....	28
3.1.3.3	Inseminação Artificial.....	28
3.1.3.4	Obstáculos.....	29
3.2	Experimento 2	30
3.2.1	Local de Estudo.....	30
3.2.2	Animais.....	30
3.2.2.1	Carneiros.....	30
3.2.2.2	Ovelhas.....	30
3.2.2.3	Rufiões.....	31
3.2.3	Rotina das Inseminações.....	31
3.2.3.1	Apartes.....	31
3.2.3.2	Obtenção de Sêmen.....	31
3.2.3.3	Inseminação Artificial.....	32
4	RESULTADOS	34
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A criação de ovinos se encontra difundida em quase todo o mundo, constituindo uma das principais atividades econômicas do setor primário de países desenvolvidos como Austrália, Nova Zelândia e do Reino Unido (DIAS, 2000).

A produção de lã é o principal produto das criações extensivas, porém a carne vem aparecendo com franco desenvolvimento. Nos países do Mercosul, a Argentina e o Uruguai se afirmam como os maiores produtores. No Brasil a criação de ovinos é uma atividade primária tradicionalmente reconhecida na região sul, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (RS) onde já foi pujante. Em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 1980, o rebanho nacional era composto por aproximadamente 17 milhões de cabeças, sendo que o RS participava com cerca de 12 milhões de animais e a região nordeste concentrava apenas 6 milhões. A partir do ano de 2006, a situação foi gradualmente se invertendo chegando ao final desse período a uma total inversão da capacidade de produção dessas duas regiões. Atualmente a região Nordeste concentra quase 10 milhões de ovinos contra menos de quatro milhões da região Sul. Tal fato se deve principalmente ao crescimento da participação das raças deslanadas, catapultadas por um grande marketing e sem dúvida pela disseminação de material genético através de biotécnicas de reprodução, onde merece destaque a inseminação artificial com sêmen congelado.

Nenhuma técnica de reprodução assistida proporciona com mais rapidez e eficácia a introdução de um material genético do que a inseminação artificial. O uso do sêmen congelado soma a isto tudo a facilidade de transporte desse material, a possibilidade de manutenção do sêmen por tempo indeterminado e ainda propicia condições de conectar distintos rebanhos pelo emprego de carneiros referência (MORAES et al., 2007).

A despeito dessas vantagens a inseminação artificial com sêmen ovino congelado não apresenta taxas de concepção semelhantes às observadas nos bovinos. O sêmen ovino apenas é viável comercialmente quando depositado diretamente no útero via laparoscopia. (MORAES et al., 2007).

Existem estudos interessantes desenvolvidos na Noruega desde os anos 80, indicando a possibilidade de uso do sêmen ovino congelado via cervical (PAULENZ et al., 2004), o que poderia tornar o seu uso mais acessível. Isso reduziria os custos, considerando-se que não exige a mão de obra especializada nem o material de custo

elevado das técnicas laparoscópicas e não provoca os traumatismos na cérvix ocasionados pela técnica transcervical.

Vivenciando condições completamente opostas na criação ovina na região da campanha do Rio Grande do Sul o presente experimento tem por objetivo proporcionar aos criadores condições para o uso de sêmen ovino congelado, visando uma maior interligação entre os rebanhos, permitindo o desenvolvimento de programas mais efetivos de melhoramento genético.

Os objetivos do presente estudo são os de verificar:

- os efeitos dos processos de congelamento e descongelamento sobre a fertilidade do sêmen de diferentes carneiros;
- a influência da condição corporal do rebanho de inseminação;
- a influência do período da estação reprodutiva e do momento após a detecção do cio em que ocorrem as inseminações na eficiência reprodutiva final do rebanho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Ovinocultura

Uma indiscutível utilidade econômica aliada a um temperamento dócil, fez da domesticação da espécie ovina uma das mais antigas da história da civilização acreditando-se ter ocorrido a mais de 4000 a.C, na Ásia Central. Ao longo do tempo foram ocorrendo adaptações em função do clima, solo, disponibilidade de água, alimento e utilização econômica de tal forma que se estima hoje existirem mais de 1400 raças de ovinos em todo o mundo. Estas raças estão classificadas de acordo com a função econômica que desempenham, constituindo o segundo maior rebanho do mundo. A seleção para lã foi obtida durante o processo de domesticação, visto que os ovinos primitivos apresentavam pelagem formada por dois tipos de fibras, uma de pelos longos e grossos e outra de pelos finos e curtos. Com a evidência da utilidade da lã sobre o pelo, foi sendo realizada progressivamente a seleção para a sua obtenção (OVINOS..., 2009).

As condições básicas para a criação, além da escolha cuidadosa da raça, são o clima, solo, pastagens, aguadas, condições de mercado, não esquecendo também a boa capacidade técnico-administrativa do proprietário e habilitação dos empregados.

Na Europa, a Grã-Bretanha, a Espanha e os países Balcãs são os três principais locais de produção ovina e os países da Comunidade Econômica Européia (CEE) têm aproximadamente 92 milhões de ovinos. No hemisfério sul a criação se concentra na Nova Zelândia e Austrália e na América do Sul, na Argentina e Uruguai. O principal produto é a lã, porém a espécie produz carne, pele e leite. No Brasil os primeiros ovinos chegaram em 1556 trazidos pelos colonizadores (ORIGEM..., 2009).

Segundo Fonseca, et al (2007) o agronegócio cresceu no Brasil nos últimos anos. Todavia, o rebanho nacional ainda é pequeno e não atende a demanda interna de produtos ovinos (i.e. carne e peles).

A importância econômica da ovinocultura como uma das principais atividades do setor primário do estado do Rio Grande do Sul se traduz em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. No ano de 2006 foi registrada uma produção de lã de 10.008 toneladas oriundas de um rebanho de 3.326.584 cabeças distribuídas em 42.293 estabelecimentos de criação numa média de 78 animais por propriedade, o que representa um total de 84% do rebanho ovino total dos três estados da região sul.

2.2 A Inseminação Artificial

A atividade reprodutiva é a expressão fisiológica de um complexo conjunto de mecanismos e fenômenos que obedecem a um rígido controle de um sistema com hierarquia de órgãos que se relacionam entre si utilizando avançada linguagem bioquímica. A influência do meio ambiente sobre o organismo nele inserido é contínua. A estacionalidade reprodutiva consiste num mecanismo da adaptação que permite que a espécie gere prole em períodos mais vantajosos para a sobrevivência, seja por mais alimentos ou pelo clima (BICUDO et al., 1999)

A Inseminação Artificial (IA) é um método de reprodução que consiste na obtenção de sêmen do macho e deposição deste no trato reprodutivo da fêmea através de instrumentos, não havendo assim nenhum contato direto entre os reprodutores (EVANS; MAXWELL, 2007), sendo uma forma de acasalamento idealizado pelo homem para proporcionar a fecundação de fêmeas com sêmen de machos selecionados em outros ambientes, em outras épocas, de outras raças, subespécies, ou até de outras espécies, visando incrementar a produção e a manutenção de genótipos locais ou exóticos (GONÇALVES, 2008).

A IA não é uma técnica para aumentar a fertilidade do rebanho, mas sim, um método alternativo de acasalamento, que permite o uso mais intensivo de reprodutores geneticamente superiores (RIET-CORREA et al., 1998).

Segundo Mies Filho (1987) a primeira IA foi relatada em uma lenda árabe e foi realizada na espécie eqüina, porém o primeiro marco histórico foi de Lazzaro Spallanzani que inseminou uma cadela com sêmen coletado por masturbação o que resultou no nascimento de três produtos vivos.

Aqui se deve mencionar novamente uma conquista científica responsável pela maior difusão da inseminação artificial, possibilitando, em especial, acentuada economia de líquido fecundante, e favorecendo de maneira decisiva o incremento do comércio de sêmen. Trata-se da criopreservação do sêmen, descoberta pelos pesquisadores ingleses Polge, Smith e Parkes. (MIES FILHO, 1987).

Considerado como um dos pioneiros na pesquisa desta revolucionária tecnologia, o Brasil, já em 1954, por Mies Filho e Rosa, anunciava a obtenção de 54,2% de parições utilizando o processo de congelamento de sêmen em bovinos (COIMBRA FILHO, 1985). Nos ovinos esta técnica é praticada a mais de 50 anos, primeiramente na extinta URSS, se tornando rotineira, apesar de limitações temporárias sempre surgirem.

Ocorre uso comercial em outros países europeus como França e Irlanda e também noutros continentes como na Austrália e Nova Zelândia assim como em vários países espalhados por todo o mundo (EVANS e MAXWELL, 1987).

2.3 A Inseminação Artificial em ovinos no Rio Grande do Sul

Segundo Gonçalves et al. (2008) o Ministério da Agricultura foi o pioneiro na promoção do serviço de IA em ovinos no estado do Rio Grande do Sul a partir da década de 40. O primeiro posto oficial foi implantado em 1943, na Fazenda Cinco Cruzes atual Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sul Brasileiros da Embrapa, no município de Bagé. Em 1949 foi criado o Serviço de Fisiopatologia da Reprodução (SFRIA).

Em nosso país os primeiros nascimentos de cordeiros gerados através de IA com sêmen congelado ocorreram em 1965, em trabalhos efetuados por Mies Filho e Rasch, na Estação Experimental Cinco Cruzes em Bagé (COIMBRA FILHO, 1985).

Foi com o surgimento do congelamento de sêmen bovino em pellets, no Japão em 1964, que a pesquisa em IA com sêmen ovino congelado ganhou novo alento. Com isto pesquisadores de várias partes do mundo começaram a testar esse método para utilizá-lo com sêmen de carneiro. No Brasil os melhores resultados alcançados ocorreram em 1978 na UEPAE Cinco Cruzes em Bagé, quando Dutra, Mies Filho e outros empregando o sêmen congelado na forma de pellets conseguiram 25% de prenhez usando uma inseminação por cio e 30% de prenhez quando usaram duas inseminações no mesmo cio em ovelhas da raça Corriedale (COIMBRA FILHO, 1985).

2.4 A Inseminação Artificial em ovinos com sêmen fresco e com sêmen congelado

Donavan et al. (2004) confere aos programas eficientes de IA a capacidade de trazer uma rápida evolução aos rebanhos através de eficiente disseminação de material genético proporcionando benefícios a rebanhos de pedigree assim como a rebanhos comerciais com respostas eficientes e positivas ao consumidor. O uso da IA permite que um único carneiro sirva centenas de fêmeas, possibilitando assim, que a carga genética de animais superiores se dissemine rapidamente.

Biscarde et al. (2007) descreve que a inseminação artificial de ovinos surge como uma biotecnologia fundamental para a disseminação de material genético de machos considerados superiores. Entretanto para que sejam maximizados os benefícios dessa biotécnica é fundamental associá-la às técnicas de processamento de sêmen, seja

ele o resfriamento ou o congelamento. Também enfatiza que para se obter índices de fertilidade satisfatórios com os programas de IA em propriedades de ovinos, além de sêmen de boa qualidade, devem ser empregadas condições ideais de manejo nutricional e sanitário.

Meira Jr et al. (2007) classifica os ovinos como sendo animais poliéstricos estacionais. Esta sazonalidade é determinada pela redução da luminosidade, que por sua vez regula a secreção de melatonina, intimamente ligada à secreção pulsátil de hormônio luteinizante (LH), fazendo com que a atividade sexual desta espécie, no hemisfério sul se concentre nos meses de outono e inverno.

Elwisby et al.(1976) relata que os ovinos tem uma maior atividade sexual no outono e que os ejaculados são mais concentrados e com maior volume.

Segundo Grotte (1992) o estro dos ovinos tem duração que varia entre 20 a 40 horas, sendo que a ovulação ocorre de 24 a 30 horas após o seu início. Evans e Maxwell (1987) relatam que em ovelhas Merino Australiano o estro dura de 24 a 42 horas e a ovulação ocorre normalmente 25 a 30 horas após o início do estro. Paulenz e Soderquist (2005) determinam que o ciclo estral da espécie ovina varia entre 16 e 17 dias. A ovelha tem um período de gestação aproximadamente de 150 dias (FONSECA et al., 2007).

Fiser e Fairfull (1983) relatam que há influência do fotoperíodo na capacidade do sêmen ovino em resistir ao congelamento salientando que o vigor do sêmen dos ejaculados obtidos em períodos de luminosidade crescente diminui. Colas et al. (1988) coletaram oitenta carneiros Ille de France de outubro de 1980 a dezembro de 1983 e relatam que ocorre um maior número de espermatozóides durante as coletas de outono, relatando ainda, em estudo de 1985, a influência que o fotoperíodo exerce sobre a produção e a fertilidade do sêmen desses animais.

Paulenz e Soderquist (2005) relatam que a Inseminação Artificial Cervical (IAC) em ovinos com o uso de sêmen congelado é realizada na Noruega desde a década de 60.

O sêmen ovino vem sendo congelado desde os anos 50 sem, contudo haver uma consolidação da tecnologia, já que não há repetitividade de resultados após inseminação artificial cervical. Os melhores resultados são via intra-uterina por laparoscopia, porém seu uso requer equipamentos específicos que oneram a etapa de reprodução. A eficiência é afetada significativamente pelo fator propriedade, condição corporal e as interações propriedade e tipo de sêmen e propriedade e condição corporal.

As diferenças observadas podem ser explicadas pelos distintos sistemas de criação, protocolos, raças e pelos diferentes níveis de condição corporal (MORAES et al., 2007).

Donavan et al. (2004) consideram que a inseminação artificial cervical em ovinos é freqüentemente limitada pela baixa fertilidade com o uso de sêmen congelado. A única exceção a isto ocorreu na Noruega, sendo reportadas taxas de não retorno de aproximadamente 60%. Há uma significativa influência do inseminador, do tipo de sêmen (se fresco ou congelado), mas principalmente da raça das ovelhas na taxa de fertilização do rebanho, quando se opta pelo uso de sêmen congelado em programas de inseminação cervical. As taxas de prenhes com sêmen fresco são de aproximadamente 75%. Os autores relatam que a diminuição da motilidade progressiva ocasionada pelo processo de congelamento/descongelamento resulta num decréscimo da capacidade do espermatozóide em penetrar a cérvix. Estudos dos mesmos autores, com a raça Finnish Landrace utilizando sêmen congelado resultaram em taxas altas de prenhes, quando de inseminações realizadas 57h após a remoção de esponjas, porém esse intervalo pode não ser tão positivo para outras raças. Há diferenças entre a estrutura anatômica da cérvix de ovelhas Merino e das raças britânicas sendo relatado pelos pesquisadores que não houve diferença de fertilidade entre o uso de cio natural ou sincronizado. Os testes de eficiência fertilizadora de sêmen congelado são ferramentas que podem orientar sobre a eficiência dos carneiros. Relata também que não há diferença significativa entre as taxas de NR e o número de cordeiros nascidos.

Donavan et al. (2004) relatam também que a IA ovina pode ser feita em quatro pontos do trato reprodutivo feminino, quais sejam:

-Vaginal - deposição na parte anterior da vagina, com eficiência muito variável e impraticável com sêmen congelado. Segundo Evans et al. (1988) essa técnica só é viável com sêmen de alta concentração espermática;

-Cervical – apresenta baixo custo e relativa facilidade de aplicação. As taxas de concepção variam bastante conforme o tipo de sêmen utilizado. O sêmen fresco e refrigerado tem eficiência entre 75 a 65%, porém quando se utiliza sêmen congelado essas taxas se estabelecem entre 10 e 30%;

-Trans cervical - realizada mediante tração da cérvix para o interior da vagina, com alto grau de manipulação, ocasionando traumas ao órgão e as taxas de prenhes ficam em torno de 57%.

-Intrauterina - consiste na deposição do sêmen diretamente dentro dos cornos uterinos. Sua grande vantagem é o reduzido número de espermatozoides utilizados com

taxas de fertilização variando entre 50 a 80%, tendo como desvantagens o custo do material e exigir boa técnica do operador.

A IA laparoscópica requer doses de 50 milhões de espermatozóides com aproximadamente 50% de eficiência, utilizando uma mão de obra especializada, material caro e necessitando que os animais tenham o estro sincronizado, enquanto que na IAC a concentração de 200 milhões de espermatozóides por dose leva a 30% eficiência, sendo de técnica simples utilizando cio natural porém essa concentração espermática quatro vezes maior é um importante detalhe, que aumenta o custo financeiro da técnica (MORAES et al., 2007 – Documentos Série Embrapa Outubro 2007 ISSN 0103-376X).

Evans (1988) relata que um dos maiores avanços na indústria da reprodução de ovinos nos últimos anos foi a inseminação via laparoscópica e que ha necessidade de avanços particularmente no controle da ovulação, no momento da IA e na dose de espermatozóides mais adequada. Nas ultimas décadas, os avanços nas técnicas de criopreservação de espermatozóides ovinos foram tímidos e se considerarmos todo o potencial que a IA exerce no desenvolvimento genético, este só ira realmente acontecer se os métodos de congelamento tornem a IA cervical, e até mesmo a IA vaginal formas viáveis do uso desse material ou quando métodos de IA profunda via cervical ou intrauterina estejam mais desenvolvidos

Donavan et al, (2004) consideram que o sêmen de carneiros selecionados para congelamento deve apresentar uma motilidade maior que 3 (0-5) e uma concentração mínima $2,5 \times 10^9$ espermatozóides por ml. Grotte (1992) refere que o volume de sêmen ejaculado por um carneiro varia de 0,5 a 2 ml e que um animal para ser aceito como doador de sêmen visando congelamento deve ter como valores mínimos um volume de 0,5 ml, uma motilidade progressiva de 75%, uma concentração de 3×10^9 espermatozóides por ml com 90% de gametas normais. Paulenz e Soderquist (2005) dizem que o sêmen a ser congelado necessita ter 65% de motilidade e 90% de espermatozóides normais.

Segundo Hafez (1988) o volume ejaculado varia de 0,3 a 2 ml, com concentração de 1 a 5 bilhões, motilidade de 60-90% com 10 a 30% de espermatozóides anormais.

Alessandro e Martemucci (2003), coletando o sêmen de cinco carneiros da raça Laccese duas vezes por semana durante um ano obtiveram sêmen com melhor taxa de

sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento das palhetas carregadas de sêmen coletado e congelado nos meses de verão e outono.

Nava et al. (2003) utilizando 1979 ovelhas Corriedale que eram inseminadas com sêmen acondicionado em palhetas de 0,5 ml, com concentração de 200 milhões (IAC/IATC) e em concentração de 60 milhões (IAL) conseguiu taxas de prenhez de 13,4%, 14,4% e 47,2% respectivamente para IAC, IATC e IAL. O mesmo comenta sobre os altos custos em termos de material da técnica de IAL, dos traumas à cervice e até mesmo ao animal na técnica de IATC e ainda sobre resíduos deixados na carne de animais submetidos a programas de sincronização de cio.

Segundo relata Grotte (1992) em seus trabalhos a campo com aproximadamente 900.000 ovelhas, utilizando a técnica de IAC com sêmen congelado em palhetas, com concentrações de 200×10^6 e realizando duas inseminações ao dia, com cio detectado por rufiões duas vezes ao dia utilizando três raças ovinas originárias da Noruega, atingiu com a raça Spelsau, taxas de NR de 65,7%. O pesquisador salienta a grande influência que exerce a raça da ovelha e o carneiro no sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado pela via cervical.

Cueto e Gibbons (2002) relatam que as IA em que se usa cio sincronizado tem menor fertilidade que o natural e quanto maior for a dose de eCG menor será a taxa de prenhes. Em seus estudos detectaram uma variação de 21 a 75% na eficiência dos sete carneiros utilizados os quais apresentaram alterações seminais detectadas principalmente após o descongelamento. Nestes estudos eles alcançaram 47% de prenhes com inseminações artificiais laparoscópicas (IAL). As IAL em cios de retorno, após o uso de cio sincronizado, e realizadas 12 horas após a detecção deste alcançaram 65% de prenhes.

Santiago *et al.* (2007) conferem as ovelhas da raça Merino Australiano uma baixa performance reprodutiva. As diferenças entre raças é também feita por Donovan *et al.* (2004) que relatam a grande influencia que tem a raça nas técnicas reprodutivas em que se utiliza sêmen congelado. Este mesmo grupo de pesquisadores detectaram que ocorre diferença de fertilidade no sêmen de carneiros doadores. Em seus estudos as raças Belclare, Texel e Suffolk atingiram taxas de prenhes de 61%, 46% e 28% respectivamente.

Kaya *et al.* (2001) realizaram implantes de melatonina em carneiros doadores de esperma durante e fora da temporada reprodutiva e concluíram que isso resulta num aumento na capacidade de suportar o processo de congelamento e descongelamento,

num aumento da fertilidade e numa diminuição dos danos as estruturas dos espermatozóides.

Segundo relatam Souza *et al.* (2005) os rufiões são utilizados na implementação de varias biotécnicas de reprodução em ovinos, como por exemplo na detecção de estro em programas de IA, indução de ovulação fora da estação reprodutiva (efeito macho) e na determinação da eficácia do acasalamento pela taxa de não retorno ao estro ao final da temporada de reprodução. Lucidi *et al.* (2001) relatam que o chamado *ram-effect* é um método que propicia o encurtamento o período de anestro das ovelhas expostas a um carneiro antes da temporada reprodutiva. Eles consideram esse efeito carneiro como uma ferramenta eficiente em trabalhos à campo, quando se deseja que a temporada de reprodução se inicie mais cedo, pois após a exposição a um carneiro um gatilho é disparado que leva ao desenvolvimento dos folículos de fêmeas quer estejam ou não em anestro.

Paulenz e Soderquist (2005) citam que o carneiro, o local de deposição do sêmen, o processo de detecção de cio e as instalações exercem grande influência nos resultados. Num rebanho de 543 ovelhas, com estro detectado por rufiões duas vezes ao dia e utilizando sêmen doado de seis carneiros, congelado em doses de 200×10^6 em 0,5 ml as inseminações cervicais atingiram 75,4% (199/264).

Biscarde *et al.*(2007) utilizando a técnica de IAL sêmen congelado com 100×10^6 espermatozóides por dose, em cios sincronizados alcançaram 37,78% de prenhes.

Winsor (1995) relata que o fator mais influente para o sucesso da técnica de IAC é a capacidade que o espermatozóide deve possuir para vencer a barreira da cérvice da ovelha após ter resistido às injúrias do congelamento e do descongelamento. Entre os fatores que contribuem para isso são a anatomia da reprodutora e a capacidade do inseminador para depositar o sêmen o mais profundo no aparelho genital feminino, sem contudo provocar traumatismos.neste. O mesmo autor relata que a utilização de estros durante a estação reprodutiva e sem utilização de sincronização apresenta maiores índices de fertilidade, sendo vantajoso em programas de IA que utilizem a técnica cervical.

A mesma referencia anterior considera que as inseminações pela via cervical as fêmeas ovinas múltiparas têm melhor desempenho pela menor dificuldade de penetrar mais profundamente a cérvice. Poderia se selecionar um rebanho de inseminação pelo grau de penetração de cérvice.

Giacomelli *et al.* (2007) consideram que os avanços na área de biotecnologia reprodutiva dos ovinos tem sido bastante significativos e que estes avanços se devem substancialmente aos obtidos na área de anatomia e fisiologia reprodutiva da espécie. Em análises de peças de frigorífico de 80 ovinos de raças produtoras de carne com idade de 2,5 a 8 anos e peso variando de 50 a 70 Kg num escore de condição corporal de 3,0 a 3,5 após cuidadosa dissecação das peças e anotação em fichas individuais o comprimento da cérvice foi de 10,2 cm (+/-1,1), com diâmetro cranial da de 1,5 cm (+/-1,2), com diâmetro medial de 1,5 cm (+/-1,1) e diâmetro caudal de 1,7 cm (+/-1,8). O número de anéis cervicais é 6 (+/-1,1) e o comprimento vaginal totalizou 10,2 cm (+/-1,8).

O grau de dificuldade na penetração da cérvice pode estar associado ao estágio do estro ou a anatomia da própria cérvice, que na espécie ovina tem em média aproximadamente 8 cm, com pequeninas aberturas que não fazem um trajeto reto e não se dilatam nem mesmo durante o cio. A quantidade de muco varia de acordo com a fase do estro e tende a ser bem maior no início deste e talvez uma análise da quantidade desse muco possa orientar o momento mais próximo da ovulação (EPPLESTON, 1992).

De acordo com Ribeiro (2007) as razões do baixo índice de prenhes no rebanho gaúcho podem estar associadas à baixa taxa de ovulação e ao manejo nutricional do rebanho durante o encarneamento, o que poderia ser em parte resolvido com o cruzamento de raças comerciais (Corriedale, Texel, etc) com raças mais prolíficas.

A avaliação subjetiva do nível nutricional dos ovinos pode ser feita de uma forma bastante simples, através do uso de escores de composição corporal, denominado de avaliação da condição corporal (CC). A sugestão para a obtenção de uma ótima produtividade é de que as ovelhas devem estar preferencialmente em CC3. O procedimento é facilmente realizado através da palpação dos ovinos na região lombar, considerando-se como são percebidos os apófises transversos e espinhosos, e a cobertura muscular e de gordura da região (MORAES *et al.*, 2005).

Silva Jr *et al.* (2007) consideram que a nutrição, no período pós parto, influencia no número e diâmetro dos folículos ovarianos, a precocidade interfere no desenvolvimento folicular durante a lactação e a restrição protéica altera a qualidade de oócitos recuperados.

Meghann *et al.* (2002) relatam que os traumas ocasionados por um instrumentos não adequados como sendo os responsáveis pelas baixas taxas de fertilização nas IATC. Relatam também que o aparelho reprodutivo ovino,

diferentemente do dos bovinos, não permite a fácil passagem de cateteres conduzindo os programas de IA da espécie ovina para procedimentos via laparoscópica, os quais tem custo elevado, demandam tempo, requerem anestesia, pessoal muito treinado, equipamentos específicos e que, além disso, diminuem a vida reprodutiva dos animais. O colo da ovelha é um grande obstáculo a ser superado, principalmente por seu comprimento e por ter trajeto muito sinuoso. Há duas hipóteses de se facilitar a penetração através do colo da ovelha, uma é alinhá-lo mediante tração com pinça hemostática, e a outra é relaxá-lo, aumentando seu diâmetro com ocitocina ou prostaglandina.. King *et al.* (2004) relatam que a aplicação de ocitocina não permite uma penetração total da cérvix da ovelha. Nesse estudo eles concluíram que a aplicação desse fármaco causou uma queda de 42 para 10% na quantidade de cordeiros oriundos de IAC com sêmen congelado. Contudo nas IAL os pesquisadores não detectaram diferenças com o uso do fármaco.

Evans (1988) relata que a inseminação vaginal só pode ser utilizada com sêmen em altas concentrações e preferencialmente fresco.

Segundo Luz *et al.* (2000) quanto mais precisa e completa for a avaliação de uma partida de sêmen, tanto melhor se poderá prever sua capacidade fecundante permitindo assim o desenvolvimento de novas técnicas de preservação de sêmen que sejam mais eficientes.

Munhoz e Parragues (2002) inseminaram ovelhas com estro sincronizado, utilizando a técnica cervical com sêmen congelado em palhetas com concentração de 200×10^6 alcançaram taxas de prenhes de 24,1%, não observando diferença entre os dois carneiros utilizados. Os mesmos autores ao analisarem a fertilidade com relação ao aspecto tanto da mucosa quanto do muco da cérvix obtiveram menores taxas quando a mucosa se apresentava pálida e com muco espesso e leitoso. As melhores taxas ocorreram nas IA com mucosas mais hiperêmicas e com muco fluido (característico da primeira metade do cio), relatando serem esses dois indicadores bons parâmetros para lograr melhor eficiência reprodutiva. Evans e Maxwell (1987) relatam que o volume e o estado físico do muco cérvico-vaginal sofrem modificações com o decorrer do cio e podem servir de parâmetro para o melhor momento para realização da inseminação. A primeira inseminação deve ser realizada no início do cio e a segunda 8 a 12 horas após.

Nos estudos de Munhoz e Parragues (2002) com IAC e sêmen congelado 3 a 6 horas após o aparte a taxa de prenhes foi de 22%, 6 a 12 horas após alcançou 32,8%, e

quando realizada às 12 e 18 horas após o aparte obteve 21,7% de eficiência. Uma única inseminação 18 horas após o aparte teve sucesso de 20,5%.

Eppleston e Maxwell (1994) diz haver um incremento de 7 a 12 % para cada centímetro a mais que se penetra na cérvix e em estudos de Munhoz e Parragues. (2002) são relatadas taxas de 35,3%, 20,7%, 23,9% 25% e 23,2% de prenhes quando a penetração atingiu zero, um, dois, três ou quatro cm dentro da cérvix. Isso pode ocorrer devido a um maior grau de manipulação do trato reprodutivo que pode levar a alterações das características físico-químicas do tecido cérvico-uterino através de uma inflamação da região.

Fukui e Roberts (1977) relatam uma haver grande influência da fase do ciclo estral no grau de dificuldade durante a penetração da cérvix da ovelha e recomenda utilizar o dedo indicador dentro do reto da ovelha com guia para se obter mais sucesso. Além disso esses autores consideram que ha uma dificuldade maior de penetração da cérvix após o a primeira inseminação e que o comprimento, o número de anéis e a curvatura dessa cérvix tem grande influência no sucesso da penetração.

Paulenz *et al.* (2004) inseminaram 5 a 12 mm dentro da cérvix 12 a 24 horas após a detecção do cio em 727 ovelhas de 9 propriedades, com cio detectado pelos rufiões 2 vezes ao dia. Atingiu taxa de NR de 78,7 %, 69%, 73,6% e 72,9% para minitubos descongelados respectivamente a 70 graus por 8 seg, e palheta a 70 graus por 5 seg, 50 graus por 9 seg e a 35 graus por 12 seg.. Não foi registrada diferenças entre os carneiros na taxa de NR.

Maxwell (1986) relata uma produção de 44,9% de cordeiros quando da IAL em um corno uterino contra 76,8% quando em dois cornos de ovelhas sincronizadas e utilizando sêmen congelado de diferentes carneiros.

Donavan *et al.* (2004) consideram que a sincronização de cio não afeta negativamente as taxas de fertilização quando comparadas ao uso de cio natural, não podendo atribuir a essa prática as taxas pouco expressivas durante o uso de sêmen congelado em IAC. A variação de eficiência entre as raças também foi avaliada tendo a raça Suffolk alcançado 12% de eficiência e a raça Finnish Landrace alcançado 61% de eficiência levando a crer num fator expressivo referente a raça.

Fair. *et al.* (2005) consideram que o local de deposição do sêmen tem importância nas taxas de prenhes do rebanho ovino, porém a raça do animal também interfere muito nessa performance. quando se utiliza sêmen congelado. Os pesquisadores, após estudos em rebanhos com estro sincronizado, utilizando IAC(56 ou

57 horas após remoção das esponjas) e com sêmen congelado em palhetas com 200×10^6 descongeladas a 70 graus por 8 minutos, concluíram que a incapacidade do espermatozóide alcançar em número suficiente o local da fertilização do óvulo é um fator que limita a fertilização nas IAC com sêmen congelado. No mesmo estudo, comparando as raças Suffolk e Belclare, também observaram que a primeira raça teve um transporte mais deficiente dos espermatozoides pelo trato reprodutivo e isto comprometeu a qualidade dos embriões.

King *et al.* (2004) relatam que o uso de mais de uma inseminação no mesmo estro não elevou as taxas de prenhes. Porém segundo estudos de Evans e Maxwell (1987) esse incremento pode ocorrer desde que a primeira inseminação seja realizada bem cedo durante o estro e a segunda de 8 a 12 horas após com um ganho de 6 a 10%.

Rabassa *et al.* (2007) obtiveram uma prenhes de 40% em inseminações artificiais transcervicais (UATC). Sendo que as taxas atingiram 25%, 43,7% e 41,7% para inseminação transcervical superficial, média ou profunda respectivamente. Os estudos foram realizados nos meses de maio e junho, com ovelhas em estro sincronizado (medroxiprogesterona e gonadotrofina coriônica eqüina), escores de condição corporal variando entre 2 e 3 e sêmen congelado numa concentração de 60×10^6 .

Salamon e Lightfoot (1967) relatam que a IAC é a técnica mais fácil de ser realizada sendo que as outras técnicas necessitam de uma maior manipulação da genitália da fêmea e que o transporte dos espermatozoides no trato genital feminino é uma das principais causas de redução de fertilidade em rebanhos inseminados com sêmen congelado através de IAC.

Hawk (1983) considera a cérvix como a principal e a mais efetiva barreira a ser superada pelo espermatozóide no sêmen congelado sendo este o local onde se inicia a inibição do transporte de espermatozoides no trato genital feminino e conseqüente não abastecimento do oviduto com esse material.

Andersen Berg e Aamdal (1991), após trabalhos realizados na Noruega, recomendam não inseminar muito cedo na temporada, pois os cios nessa fase têm baixas taxas de ovulação e ovelhas expostas a machos demasiadamente cedo na estação reprodutiva podem apresentar cios silenciosos.

Em estudos Milczewski *et al.* (2000) relatam que a refrigeração e o congelamento do sêmen causam significativo decréscimo da qualidade espermática e

determinam, conforme o tipo de inseminação, a concentração de espermatozóides por dose a ser utilizada.

Segundo Donavan *et al* (2004) o momento da IA é primordial para o sucesso no uso de sêmen congelado, principalmente pelas injúrias sofridas no trato genital feminino não havendo porém, neste sentido, nenhuma relação com a raça. As baixas taxas de prenhes normalmente alcançadas se devem talvez ao tempo de ovulação muito amplo aliado ao pouco tempo de sobrevivência do espermatozóide congelado no trato reprodutivo feminino. Taxas aceitáveis de prenhes talvez necessitem de duas inseminações por cio para assim podermos superar essa variação. Não havendo porém diferença significativa quando foram efetuadas duas inseminações com intervalo de 6 horas.

Gourley e Riese (1990) relatam a importância determinante que tem a utilização de bons protocolos de sincronização de cio de rebanhos que participem de programas de IAL. Também é de substancial importância a detecção do momento exato do estro, o que deve ser feito preferencialmente por rufiões. Os mesmos pesquisadores consideram ainda que as inseminações devem ocorrer por ordem de entrada em cio levando-se sempre em conta os fatores idade, lactação e raça.

Segundo Maxwell e Salamon (1993), o espermatozóide de ejaculados refrigerados se deteriora com o passar do tempo, com diminuição da motilidade e da integridade de suas estruturas levando a um decréscimo de sobrevivência destes no trato reprodutivo da ovelha. Isto leva a uma diminuição de fertilidade com um aumento de perdas embrionárias. Em programas de IAC, um período da refrigeração de 24h acarreta um rápido declínio de fertilidade, porém quando as técnicas de IAL e IATC são utilizadas pode até mesmo ocorrer um aumento da capacidade de fertilização desse tipo de sêmen, visto que tais técnicas diminuem os problemas de transporte através da cérvix, e minimizam as injúrias aos espermatozóides, elevando a fertilização e diminuindo perdas embrionárias.

Maxwell *et al.* (1999) analisaram a influência do uso de plasma seminal ovino como suplemento de sêmen ovino congelado usado em IAC. E concluíram o efeito positivo da ação desse plasma na motilidade e na capacidade de penetração dos espermatozóides através do muco cervical das ovelhas. Esse procedimento leva a uma diminuição nos prejuízos que os espermatozóides sofrem ao congelamento e ao descongelamento elevando assim a fertilidade em IAC.

Após trabalhos a campo, com ovelhas com estro sincronizado, Belibasaki *et al.* (2000) relatam que a adição de plasma seminal como diluente de sêmen fresco tem um efeito positivo nas taxas de fertilização do rebanho..

Comparando a eficiência das IA cervicais e laparoscópicas (técnica desenvolvida por Killen e Keffrey em 1982) com a IA transcervical de Guelph (técnica desenvolvida por Halbrt *et al.* em 1990), Winsor (1994), utilizando sêmen congelado obteve 9%, 48% e 32% respectivamente como taxas de prenhes aos 70 dias após a IA. O pesquisador relata também que a IAC poderá ser usada com mais sucesso desde que se aprimorem os métodos de penetração através da cérvix da ovelha.

Segundo Langford (1986) o peso das ovelhas influencia na taxa de fertilidade do rebanho, obtendo taxas de 13% e de 69%, respectivamente, quando utilizou o sêmen fresco em uma ou duas inseminações artificiais.

Cottrel (1985) designa o carneiro como parte de substancial importância no rebanho de criação, principalmente em rebanhos de pequeno vulto. Um carneiro em más condições é resultado certo de prejuízo, enquanto que um reprodutor em boas condições sanitárias e nutricionais pode cobrir mais fêmeas com sucesso e assim produzir mais.

Segundo estudos de Biscarde *et al.* (2007) os índices de concepção obtidos com sêmen processado são inferiores para aqueles descritos para o sêmen *in natura*, devido a sua menor estabilidade estrutural e fisiológica, o que reduz suas chances de atingir o sítio da fertilização.

Queiroz *et al.* (2007) relatam que os processos de conservação do sêmen ovino provoca sérios danos aos espermatozóides, que reduzem sua viabilidade, interferindo assim na sua sobrevivência e capacidade fecundante. A redução de fertilidade verificada após o congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente, aos danos causados às estruturas das membranas dos espermatozóides.

Um pool de sêmen tem melhor desempenho do que as doses de sêmen congelado de um doador apenas e quando não se tem a possibilidade de fazer um pool de sêmen se deve recorrer a um aumento da concentração de espermatozóides por dose para alcançar uma maior taxa de fertilidade no rebanho. Em programas de IAC a concentração a ser utilizada para se alcançar uma taxa de prenhes de 50% é a de 200×10^6 . Quanto maior for o número de espermatozóides em um menor volume, maiores serão as taxa de prenhes do rebanho (Salamon *et al.* 1977).

Eppleston e Maxwell (1994) consideram que a fertilidade do sêmen está relacionada com a motilidade e com o número de espermatozóides, exaltando as

diferenças entre as taxas de prenhes entre carneiros e diferenças inclusive na capacidade de movimentação do sêmen de diferentes carneiros dentro do trato reprodutivo feminino até alcançarem o local onde ocorre a fecundação). Os mesmos autores, acompanhando os relatos Salamon *et al* (1977), relatam que essas diferenças entre carneiros podem ser superadas realizando-se *pools* de sêmen e quando isso não for permitido deve-se aumentar a concentração mínima fertilizante.

Winsor (1997) em estudos realizados utilizando a técnica de IAC com sêmen congelado de sete carneiros Merino Australiano, concluiu que ocorre variação de capacidade fertilizante do sêmen congelado de carneiro para carneiro assim como entre ejaculados de um mesmo carneiro.

A coleta de sêmen visando o congelamento é realizada preferencialmente com o uso da vagina artificial, e é o que indica o estudo de Moore (1985) que comparou o sêmen de nove carneiros Romney Marsh, coletados com vagina artificial e com eletro ejaculador, concluindo que com o método da vagina se obtém ejaculados de melhor qualidade. Donovan *et al* (2004) também considera que o sêmen coletado através de vagina artificial é de melhor qualidade, pois não provoca stress ao carneiro.

Em estudos de campo Ollero, *et al* (1996) obtiveram o melhor resultado no segundo ejaculado após um período de abstinência de três dias, observando aproximadamente 60% de células viáveis na amostra.

Durante experimentos de Schoreder, *et al* (1986) carneiros Merino Australiano foram dosificados com ivermectina (1%) concluindo que o uso desse produto em machos reprodutores não tem influência alguma sobre a capacidade reprodutiva dos mesmos.

Gourley *et al* (1990) relatam que quando o sêmen congelado é utilizado o melhor momento para realização da IA é o próximo ao final do cio, tendo o inseminador substancial influência nas taxas de fertilização do rebanho.

Gillan e Maxwell (1999) consideram que, em comparação ao sêmen fresco, o sêmen congelado sofre através do ato de congelamento, um aumento da velocidade do processo de capacitação do espermatozóide, se traduzindo por um inicial aumento de sua capacidade de fertilização, porém seguido de um decréscimo dessa capacidade após incubação *in vivo* ou *in vitro*. A desestabilização das membranas espermáticas, com o processo de congelamento e descongelamento, conduz a necessidade de deposição intrauterina do sêmen para se atingir aceitáveis taxas de fertilização. Os espermatozoides de sêmen congelado que consigam atingir o ato de fertilização podem contribuir para uma maior taxa de perda embrionária ocasionado por uma alteração na

clivagem do embrião. Além dessas considerações, os mesmos pesquisadores relatam que, após a inseminação, ocorre uma grande perda de espermatozóides através da vagina, sendo que os espermatozóides de sêmen congelados além de serem expelidos mais rápido que os de sêmen fresco.

Segundo Salamon (1977) o número de espermatozóides por dose está diretamente relacionado com o aumento da fertilidade em IAC.

Epleston e Maxwell (1994) relatam que em estudo de campo com três rebanhos de cinco mil ovelhas inseminadas, pós-sincronização, utilizando técnica laparoscópica, com sêmen congelado oriundo de 110 carneiros, ocorreu grande variação da taxa de prenhes de ovelhas inseminadas com diferentes carneiros. Outro fator que contribuiu para a grande diferença de fertilidade entre os carneiros foi a maior capacidade de alguns no transporte através do trato reprodutivo da fêmea e conseqüente aporte ao local da fecundação. Esses fatores podem ser superados através de *pools* de sêmen, porém tal ferramenta não pode ser utilizada em plantéis de raças puras, por não ser possível se determinar com certeza o pai do produto. Pode-se ainda incrementar a capacidade fertilizante de determinados carneiros através de um aumento do número de espermatozóides por dose, necessitando contudo identificar as reais causas dessa baixa fertilidade.

Donavan *et al* (2004) colocam como maior obstáculo a fertilidade após a IAC com sêmen congelado é a necessidade de se alcançar uma população suficiente de espermatozóides que atinjam, à partir do cérvix, o local da fertilização.

No mesmo estudo, os pesquisadores verificaram que a capacidade fecundante de sêmen congelado em análises *in vitro* pode ser uma forma de seleção de carneiros doadores mais eficientes, pela identificação de doadores com sêmen mais resistente ao congelamento e descongelamento. Eles relatam também que a adição de 10 a 20% plasma seminal ao sêmen a ser congelado aumenta a viabilidade da amostra apesar de não influenciar na taxa de fertilização.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento 1 - Avaliação do uso de sêmen congelado em ovelhas de baixa condição corporal utilizando apenas estro natural

3.1.1 Local do estudo

O experimento foi desenvolvido em uma propriedade de criação extensiva na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul, no município de Bagé e teve início no dia 8 de março de 2007 prolongando-se até o nono dia do mês de abril do mesmo ano.

3.1.2 Animais

3.1.2.1 Carneiros

Foram utilizados doze carneiros da raça Merino Australiano mais três da raça Corriedale sendo que estes últimos apesar de não participarem do experimento, participavam da rotina da inseminação da propriedade. Dos doze carneiros do experimento, um forneceu apenas sêmen fresco (C 22) e outro que não estava na propriedade forneceu apenas sêmen congelado (C 102), os demais participaram com sêmen fresco e congelado (C 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 101). No decorrer da inseminação o carneiro número seis (C 6) veio a óbito. Estes animais eram mantidos em separado, em potreiro de campo nativo, com água oferecida à vontade no cocho e recebiam, conforme possível, alimentação extra, a base de concentrado, uma ou duas vezes ao dia. O estado nutricional não era o adequado, com escore da condição corporal em torno de dois. No decorrer do experimento os animais receberam somente uma dosificação via oral a base de Ivermectina a 1%.

3.1.2.2 Ovelhas

Aproximadamente 2500 ovelhas das raças Merino Australiano, Ideal e Corriedale compunham o rebanho de inseminação da propriedade, porém no presente experimento foram utilizados apenas os animais das raças Merino e Ideal (aprox.2000 ovelhas). Estes animais eram mantidos em potreiro único, com aproximadamente 250 há de campo nativo e com fontes naturais de água. O estado nutricional e sanitário geral do rebanho não era bom, com escore de condição corporal dois, apresentando no

decorrer dos trabalhos um elevado número de casos de mifase, manqueira e parasitoses gastrointestinais, que inclusive levaram vários animais a óbito..

3.1.2.3 Rufiões

Os animais utilizados para a detecção de estro no rebanho eram machos, sem raça definida ou mestiços, castrados e estrogenizados, com uma proporção de no máximo 2:100. Estes receberam tratamento hormonal que consistiu na aplicação intramuscular de 2mg de Cipionato de Estradiol (ECP, Pharmacia, Brasil) quinze dias antes de serem soltos no rebanho. Após a primeira dose os animais receberam um reforço aos sete dias e a partir daí reforços com a mesma dose a cada quinze dias. Os animais de reserva eram mantidos em potreiro separado, de campo nativo e aguadas naturais e tinham o mesmo tratamento hormonal. Os animais em atividade eram mantidos sempre junto ao rebanho utilizando-se como marcador, nos primeiro quatorze dias, tinta de cor amarela com graxa aplicada no peito, que foi trocada por cor verde e após por vermelha. Apesar de não apresentarem nem a proporção nem as condições ideais e de trabalharem num potreiro de grandes dimensões os animais desempenharam bem a função, detectando estro em mais de 50% do rebanho no período do experimento.

3.1.3 Rotina das Inseminações

3.1.3.1 Apartes

Após as 7 horas da manhã, o rebanho de inseminação era recolhido em uma mangueira distante aproximadamente 3 km da sede da propriedade, para serem identificados e retirados os animais assinalados em estro pelos rufiões. O serviço de recolher os animais era bastante demorado, devido não só pelas grandes dimensões do potreiro, mas também pelo escasso número de funcionários. Após estarem na mangueira os animais eram passados pelo brete onde se apartava para um lado ovelhas marcadas em cio e rufiões e para o outro ovelhas não marcadas. Depois ocorria um novo aparte, desta vez os rufiões, que deveriam ser pintados e os animais que deveriam receber curativos. Após era o momento de realizar curativos nas ovelhas que estavam fora do cio. Na seqüência, os animais eram conduzidos até a sede, onde ocorriam novos apartes. As ovelhas do experimento eram separadas das Corriedale. Após as ovelhas do experimento eram separadas em lote branco, lote ponto azul e lote ponto vermelho. Neste momento se anotava os números de brinco ou de tatuagem das ovelhas ponto azul

e ponto vermelho se determinando por qual carneiro se começaria a trabalhar. Feito isso, as ovelhas permaneciam nas mangueiras para serem inseminadas à tarde. Nesse momento os carneiros eram recolhidos do potreiro para um pequeno curral onde permaneciam para se proceder a coleta de sêmen.

A partir das 13 horas começava então a rotina de inseminação propriamente dita. Os primeiros lotes inseminados eram os de ponto vermelho e de ponto azul, visto que eram que absorviam mais tempo, por terem os carneiros previamente determinados para cada ovelha. Após eram inseminadas as ovelhas Merino Australiano sem ponto e ao final se trabalhava com as ovelhas Corriedale.

3.1.3.2 Obtenção do sêmen

Nosso experimento estava orientado na utilização, por ordem de manifestação de cio, do sêmen fresco ou congelado em inseminações cervicais superficiais. Os procedimentos, quando do uso de sêmen fresco se iniciavam com a coleta dos carneiros com auxílio de manequim vivo e devidamente contido em tronco apropriado. O método utilizado era o de vagina artificial, a qual era preenchida com água previamente aquecida a 37°C, lubrificada com vaselina sólida e estéril e com o copo coletor protegido da incidência direta de luz. Após a obtenção do material o sêmen era analisado macroscopicamente quanto ao volume, ao aspecto (cremoso, leitoso ou aquoso) e a qualidade dos flocos (grossos, médios e finos). Após essa análise o material era mantido em um isopor com água morna a 37°C ao abrigo do vento e da claridade. A inseminação era feita com material descartável no volume de 0,1 ml por ovelha medida com seringa de insulina. O sêmen congelado era mantido em botijão com nitrogênio líquido recarregado regularmente e foi previamente obtido dos mesmos carneiros doadores de sêmen fresco, os quais foram coletados de janeiro de 2006 a janeiro de 2007. O protocolo de congelamento foi o de Fiser e Fairfull (1984), com uma concentração final de 200×10^6 espermatozóides por dose, envasado em palhetas de 0,5 ml carregadas com um volume de 0,25 ml. Neste caso, a deposição do sêmen na ovelha era feito com aplicador de sêmen para bovinos com bainha protetora descartável após descongelamento em recipiente com água morna a 35°C por 30 segundos.

3.1.3.3 Inseminação Artificial

Todas as inseminações foram efetuadas à tarde. Após a condução do primeiro lote para o interior da cabanha, dentro da qual se procedia a inseminação, as ovelhas

eram colocadas uma a uma em tronco giratório com o pescoço preso na guilhotina e o posterior levantado por uma cinta sob o abdômen. Isso imprimia um bom ritmo à atividade, pois sempre que uma ovelha estava sendo inseminada a anterior estava sendo solta e outra contida em seu lugar. A ovelha a ser inseminada, era identificada pelo número do brinco ou da tatuagem e se não tivesse nenhum destes era colocado um número pela ordem de chegada, do lado esquerdo do tórax permitindo assim sua posterior identificação. Feito isto o animal tinha o períneo limpo com toalha de papel descartável e a entrada da cérvix era visualizada através de espéculo vaginal com fonte de luz própria. O sêmen era então depositado o mais profundo possível dentro do colo uterino, porém de forma suave visando que não ocorressem traumatismos de qualquer ordem. Após, a ovelha era numerada novamente com o número do lote, dessa vez do lado direito do tórax e se analisava sua condição corporal em índices que iam de um a cinco, onde o um identifica um ovino muito magro e o cinco um extremamente obeso. Além disso, era anotado na planilha da inseminação o tipo de sêmen utilizado, o número do carneiro doador, o número de ordem da ovelha e o número do lote ao qual esta pertencia. Após o término do rebanho das ovelhas Merino Australiano, se iniciava a inseminação do rebanho Corriedale, sobre o qual só se tinha o controle de lote e quantidade de animais inseminados. Devido a grande distância entre o local das inseminações e o local onde ficavam os animais já inseminados, estes pernoitavam na mangueira até o outro dia, quando eram levados ao potreiro onde permaneceriam sem nenhum macho até a troca do lote, momento este em que eram reintroduzidas no rebanho de origem, com a presença dos rufiões, possibilitando assim a detecção das que retornavam ao cio que por consequência estavam vazias. Os lotes trocavam a cada sete dias, sendo que o lote 1 compreendeu o período de 8 a 14 de março, o lote 2 o período de 15 a 21 de março, o lote 3 o período de 22 a 29 de março, o lote 4 o período de 30 de março a 5 de abril e o lote 5 o período de 6 a 12 de abril do ano de 2007. A cor da tinta usada no peito dos rufiões era mantida por quatorze dias. Primeiramente se utilizou a tinta amarela, que foi substituída pela tinta verde e após pela tinta vermelha.

3.1.3.4 Obstáculos

No decorrer desta temporada de inseminação foram grandes as dificuldades enfrentadas para atingir os objetivos. Começando pelo grande número de ovelhas, pelo reduzido número de carneiros e rufiões, pelo tamanho dos poteiros e distância destes das mangueiras de aparte do local da inseminação, pelas condições corporais e

sanitárias de todo o plantel, pela falta de alimentação adequada aos reprodutores, falta de material de substituição, necessidade de construção de mangueiras adaptadas pelo próprio pessoal da inseminação e no decorrer das atividades, culminando com falta de pessoal, o qual era constantemente desviado de função para atividades rotineiras da estância.

3.2 Experimento 2 - Avaliação do uso do sêmen congelado em inseminações cervicais em ovelhas com bom nível de condição corporal utilizando estro sincronizado ou natural.

3.2.1 Local do estudo

O presente experimento foi desenvolvido em uma cabanha de ovinos numa propriedade rural na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul, no município de Candiota e teve início no dia 27 de fevereiro prolongando-se por um mês, até o dia 27 de março de 2007..

3.2.2 Animais

3.2.2.1 Carneiros

Todos os quatro carneiros que foram utilizados no estudo eram da raça Texel (C111, C465, C130 e C499) sendo que todos doaram sêmen fresco e somente os dois primeiros (C111 e C465) tiveram também o sêmen previamente congelado. Estes animais eram mantidos em separado dos demais, em potreiro de campo nativo, com água fresca oferecida à vontade e eram racionados com concentrado duas vezes ao dia. O estado nutricional destes reprodutores se manteve excelente durante todo o experimento.

3.2.2.2 Ovelhas

O rebanho de inseminação era composto de 373 ovelhas da raça Texel, todas com muito boa condição corporal, com escore de condição corporal em média de 3,5 e eram mantidas em um potreiro com campo nativo e fontes naturais de água. No sexto dia após o início da temporada de inseminação as ovelhas que não haviam entrado em estro receberam uma dose de prostaglandina (Sincrocio, Ouro Fino, Brasil) e foram inseminadas do sétimo ao nono dia da temporada.

3.2.2.3 Rufiões

Foram utilizados machos castrados estrogenizados na proporção de 5:100, todos eram sem raça definida, Estes receberam tratamento hormonal que consistiu na aplicação intramuscular de 2mg de Cipionato de Estradiol (ECP, Pharmacia, Brasil) quinze dias antes de serem soltos no rebanho. Após a primeira dose os animais receberam um reforço aos sete dias e a partir daí reforços com a mesma dose a cada quinze dias. Os animais reserva eram mantidos em potreiro separado, de campo nativo e aguadas naturais. Os animais em atividade eram mantidos sempre junto ao rebanho utilizando-se como marcador, nos primeiro quatorze dias, tinta amarela com graxa aplicada no peito, que foi trocada por cor verde e após por vermelha. Apesar de terem um estado nutricional que deixava a desejar os animais desempenharam um bom trabalho tendo em vista principalmente as grandes dimensões do potreiro onde era mantido o rebanho de inseminação.

3.1.3 Rotina das Inseminações

3.2.3.1 Apartes

Eram realizados diariamente dois apartes, o primeiro às 7 horas da manhã e o segundo as 17 horas. Neste momento o rebanho de inseminação era recolhido em uma mangueira para serem retirados os animais em cio. Após estarem na mangueira os animais eram passados pelo brete onde se apartava para um lado os rufiões e as ovelhas marcadas (em cio) e para o outro as ovelhas não marcadas. As ovelhas em cio eram mantidas em separado para serem inseminadas no turno posterior.

3.2.3.2 Obtenção de sêmen

O estudo estava orientado na utilização, por ordem de manifestação de cio, de sêmen fresco ou congelado em inseminações cervicais superficiais. Quando se optava pelo uso de sêmen fresco, a coleta dos carneiros se realizava com auxílio de manequim vivo e devidamente contido em tronco apropriado. O método utilizado era o de vagina artificial preenchida com água previamente aquecida a 37°C, lubrificada com vaselina sólida e estéril e com o copo coletor protegido da luz. Após a obtenção do material o sêmen era analisado macroscopicamente quanto ao volume, ao aspecto (cremoso, leitoso ou aquoso) e a qualidade dos flocos (grossos, médios e finos). Após essa análise o material era mantido em um isopor com água morna a 37°C ao abrigo do

vento e da claridade. A inseminação era feita com material totalmente descartável no volume de 0,1 ml por ovelha medida com seringa de insulina. . O sêmen congelado era mantido em botijão com nitrogênio líquido recarregado regularmente e foi previamente obtido dos mesmos carneiros doadores de sêmen fresco, os quais foram coletados de janeiro de 2006 a janeiro de 2007 . O protocolo de congelamento foi o de Fiser e Fairfull (1984), com uma concentração final de 200×10^6 espermatozoides por dose, envasado em palhetas de 0,5 ml carregadas com um volume de 0,25 ml. Neste caso, a deposição do sêmen na ovelha era feito com aplicador de sêmen para bovinos com bainha protetora descartável após descongelamento em recipiente com água morna a 35°C por 30 segundos.

3.2.3.3 Inseminação Artificial

As inseminações dos animais apartados pela manhã eram feitas a tarde e a dos animais apartados à tarde eram feitas na manhã do dia seguinte. Os animais eram conduzidos um a um e contidos em tronco giratório de inseminação próprio para ovinos com o pescoço preso na guilhotina e o posterior levantado por uma cinta sob o abdômen. A ovelha a ser inseminada era identificada pelo número do brinco ou da tatuagem e se não tivesse nenhum destes era colocado um número pela ordem de chegada, do lado esquerdo do tórax permitindo assim sua posterior identificação. Feito isto, o animal tinha o períneo limpo com toalha de papel descartável e a entrada da cérvix era visualizada através de espéculo vaginal com fonte de luz própria. O sêmen era então depositado o mais profundo possível dentro do colo uterino, porém de forma suave visando que não ocorresse traumatismos de qualquer ordem. Após, a ovelha era numerada novamente com o número do lote, dessa vez do lado direito do tórax e se analisava sua condição corporal em índices que iam de um a cinco, onde o um identifica um ovino muito magro e o cinco um extremamente obeso. Além disso, era anotado na planilha da inseminação o tipo de sêmen utilizado, o número do carneiro doador, o número de ordem da ovelha e o número do lote ao qual esta pertencia. Por fim as ovelhas inseminadas formavam um novo lote, num potreiro separado e aí permaneciam até a troca do lote, quando então eram reintroduzidas no rebanho principal sendo expostas novamente ao rufões., possibilitando assim a detecção das que retornavam ao estro que por consequência estavam vazias. Os lotes trocavam a cada sete dias, sendo que o lote 1 compreendeu o período de 27 de fevereiro a 5 de março, o lote 2 o período de 6 a 12 de março, o lote 3 o período de 13 a 19 de março e o lote 4 o período de 20 a

26 de março do ano de 2007. A cor da tinta usada no peito dos rufiões era mantida por quatorze dias. Primeiramente se utilizou a tinta amarela, que foi substituída pela tinta verde e após pela tinta vermelha.

4 RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 - Avaliação de inseminações artificiais com uso de sêmen congelado em ovelhas em baixa condição corporal.

Tabela 1 - Taxa de não retorno (NR) por carneiro das 1046 ovelhas inseminadas pela via cervical com sêmen fresco (SF) ou sêmen congelado (SC).

<i>CARNEIRO</i>	<i>% NR Sêmen fresco</i>	<i>Total ovelhas inseminadas</i>	<i>% NR Sêmen congelado</i>	Total ovelhas inseminadas
C102	--	--	22 (22%)	100
C101	67 (43,2%)	155	34(28,9%)	121
C22	31 (44,9%)	69	--	-
C10	14 (21,2%)	66	--	5
C8	19 (26,8%)	71	2 (33,3%)	6
C7	22 (24,4%)	90	1 (33,3%)	3
C6	--	4	9 (19,6%)	46
C5	15 (25,4%)	59	1 (33,3%)	3
C4	19 (43,2%)	44	1 (14,3%)	7
C3	14 (28%)	50	1 (25%)	4
C2	23 (39%)	59	1 (16,7%)	6
C1	35 (45,4%)	77	-	1
Total	259 (34,8%)	744 (71,1%)	72 (23,4%)	302 (28,9%)

Análise estatística demonstrou haver diferença entre os dez carneiros doadores de sêmen fresco ($\chi= 28,502$; 9 GL; $P=0,001$), onde a maior taxa de NR foi a do carneiro C1 com 45,4% (35/77) e a pior foi a do carneiro C6, o qual após o início da inseminação começou a ter problemas de saúde, vindo a óbito e doando sêmen apenas para quatro ovelhas. Estatisticamente o uso de do uso de sêmen congelado não determinou haver diferença ($\chi= 1,795$; 2 GL; $P= 0,408$) entre os três carneiros dos quais foi utilizado com mais efetividade esse tipo de sêmen (C102, C101 e C6). O carneiro C6 teve o menor número de ovelhas inseminadas com esse sêmen e teve a menor taxa de NR com 19,6% (9/46). O carneiro 101 foi o único que possibilitou uma comparação entre o sêmen fresco e o sêmen congelado e demonstrou haver diferença ($\chi=6,701$, 1GL; $p=0,01$) na taxa de NR ficando o material a fresco com um NR de 43,2% (67/155) e o congelado com 28,9% (34/121).

Tabela 2 - Taxa de não retorno (NR) dos quatro lotes das inseminações artificiais cervicais (IAC) com sêmen fresco (SF) ou sêmen congelado (SC)

<i>LOTE</i>	<i>% NR Sêmen fresco</i>	<i>Total ovelhas inseminadas</i>	<i>% NR Sêmen congelado</i>	Total ovelhas inseminadas
L1	124 (54,9%)	226	20 (29%)	69
L2	51 (22,3%)	229	41 (22,9%)	179
L3	78 (44,1%)	177	11 (37,9%)	29
L4	3 (3,2%)	94	-	18
L5	3 (16,7%)	18	-	7
Total	259 (34,8%)	744 (71,1%)	72 (23,4%)	302 (28,9%)

A comparação das taxas de NR dos lotes 1, 2 e 3, que concentraram a maior parte das ovelhas inseminadas demonstrou haver diferença entre os diferentes lotes ($\chi=37,448$; 2GL; $P=0,0001$) onde o lote dois (L2) teve o pior desempenho, com 22,5% (408/92) e os L1 e L3 tiveram 48,8%(144/295) e 42,2%(89/206) O uso do sêmen fresco também revelou uma diferença de eficiência entre os lotes ($\chi=52,013$; 2GÇ; $P=0,001$, e o lote dois novamente teve o desempenho mais fraco porem todos os lotes tiveram eficiência abaixo do esperado.Quando foi utilizado o sêmen congelado essa diferença de eficiência não ocorreu, ($\chi=3,357$; 2GL; $P=0,187$) com o lote 3 alcançando 37,9% (11/29) e os demais com eficiência sempre maior que 20%.

Tabela 3 - Taxa de não retorno (NR) de ovelhas inseminadas pela via cervical classificadas por escore de condição corporal (CC) com uso de sêmen fresco (SF) ou sêmen congelado (SC)

<i>Condição Corporal (CC)</i>	<i>% NR Sêmen fresco</i>	<i>Total ovelhas inseminadas</i>	<i>% NR Sêmen congelado</i>	Total ovelhas inseminadas
CC1	137 (32,5%)	422	26 (20,5%)	127
CC2	101 (36,7%)	275	43 (29,3%)	147
CC3	21 (47,7%)	44	3 (12,5%)	24
CC4	-	3	-	4
Total	259 (34,8%)	744 (71,1%)	72 (23,4%)	302 (28,9%)

A análise revela não haver diferença entre as taxas de não retorno entre sêmen fresco e sêmen congelado nos escores de condição corporal 1, 2 e 3 ($\chi= 2,556$; 2GL; $P, 0,28$), porem a tendência dessa eficiência foi a de se elevar quando a CC dos animais melhorava sendo de 29,6 (163/549) na CC1, 34,1% (144/422) na CC2 e de 35,2% (24/68) na CC3. O uso de sêmen fresco ou sêmen congelado também não acarretou diferença na s taxas de NR das diferentes CC($\chi=4,688$; 2GL; $P= 0,09$ e $\chi= 4,803$; 2GL; $P=0,09$, respectivamente., tendo crescido sempre com o sêmen fresco e tendo uma queda no sêmen Congelado apenas na CC3.

EXPERIMENTO 2 - Avaliação do uso do sêmen congelado em inseminações cervicais após 12 h do início do cio em ovelhas com cio sincronizado e natural.

Tabela 1- Taxa de não retorno (NR) por carneiro das 373 ovelhas inseminadas pela via cervical com sêmen fresco (SF) ou sêmen congelado (SC).

CARNEIRO	% NR Sêmen fresco	Total ovelhas inseminadas	% NR Sêmen congelado	Total ovelhas inseminadas
C111	7 (41,2%)	17	26 (28,9%)	90
C130	1 (10%)	10	-	-
C465	7 (30,4%)	23	22 (22,9%)	96
C499	92 (67,1%)	137	-	-
TOTAL	107(57,2%)	187(50,1%)	48(25,8%)	186(49,9%)

Em uma avaliação da taxa de não retorno geral dos carneiros que participaram do experimento com sêmen fresco e congelado (C 111 e C 465) revelou não haver diferença entre os dois tipos ($\chi= 0,076$; 1GL; $P= 0,783$) ficando em 30,8%(33/107) no C111 e em 24,4%(29/119) no C465. Analisando o NR com sêmen fresco dos carneiros 111, 465 e 499 conferimos que houve diferença entre os animais ($\chi=23,160$; 3GL; $P=0,0001$, tendo o C499 alcançado a melhor taxa em 67,1%992/137), No sêmen congelado não houve diferença ($\chi= 0,865$, 1GL; $P= 0,352$)entre os dois animais participantes (C111 e C 465).mantendo ambos uma eficiência acima de 22%.

Tabela 2 - Taxa de não retorno (NR) dos quatro lotes das inseminações artificiais cervicais (IAC) com sêmen fresco (SF) ou sêmen congelado (SC).

LOTE	% NR Sêmen fresco	Total ovelhas inseminadas	% NR Sêmen congelado	Total ovelhas inseminadas
L1	7 (26,9%)	26	5 (26,3%)	19
L2	12 (50%)	24	20 (26%)	77
L3	26 (49%)	53	8 (19,5%)	41
L4	62 (73,8)	84	15 (30,6%)	49
TOTAL	107	187	48	186

A avaliação conjunta da taxa de não retorno dos dois tipos de sêmen (SF e SC) do experimento revelou diferença de eficiência entre os lotes ($\chi=21,158$; 3GL; 0,0001), onde o lote dois (L2) teve o pior desempenho com um NR de 21,8%(22/101) e o lote 4 (L4) o melhor com 57,8%(77/133).Na análise da eficiência do sêmen fresco essa diferença se manteve($\chi=21,147$; 3GL; $P=0,0001$), tendo contudo tendência a aumentar a eficiência. O sêmen congelado se manteve estável no decorrer da inseminação ($\chi 1,443$; 3GL; $P=0,695$) tendendo sempre ao crescimento da sua eficiência e atingindo no L4 30,6% (15/49)

Tabela 3 - Taxa de não retorno (NR) de ovelhas inseminadas pela via cervical classificadas por escore de condição corporal (CC) com uso de sêmen fresco (SF) ou sêmen congelado (SC).

<i>Condição corporal (CC)</i>	<i>% NR Sêmen fresco</i>	<i>Total ovelhas inseminadas</i>	<i>% NR Sêmen congelado</i>	Total ovelhas inseminadas
CC2	16 (55,2%)	29	7 (21,9%)	32
CC3	33 (55,9%)	57	26 (28,9%)	90
CC4	58 (57,4%)	101	15 (23,4%)	64
TOTAL	107	187	48	186

A análise demonstra haver diferença da eficiência reprodutiva, através da taxa de NR, nas CC2, CC3 e CC4 ($\chi= 8,447$; 2GL; P= 0,01), onde a CC2 teve o pior desempenho com 37,7%(23/61) e se mantendo em 43 e 44,2% na CC3 e CC4.. O desempenho do sêmen fresco não representou diferença entre as três CC($\chi= 0,062$; 2GL;0,969) ficando sempre em torno de 55%. O mesmo ocorreu com o sêmen congelado ($\chi= 0,893$;2GL; P= 0,64).que esteve sempre acima de 20% nas diferentes CC e que concentrou sua melhor eficiência na CC3, com 28,9% (57/90).

Tabela 4 - Taxa de não retorno (NR) de sêmen fresco (SF) e de sêmen congelado com relação ao turno da inseminação artificial (IA).

<i>Turno de inseminação</i>	<i>% NR Sêmen fresco</i>	<i>Total ovelhas inseminadas</i>	<i>% NR Sêmen congelado</i>	Total ovelhas inseminadas
MANHÃ	53 (57%)	93	22 (22,9%)	96
TARDE	54 (57,4%)	94	26 (28,9%)	90
TOTAL	107	187	48	186

Não houve diferença estatística entre os dois turnos de inseminação ($\chi=0,182$, 1GL; P=0,67) ficando a taxa de NR da manhã em 39,6%(75/189) e a do turno da tarde em 43,5% (80/184).

5 DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1 - Avaliação de inseminações artificiais com uso de sêmen congelado em ovelhas em baixa condição corporal.

Na investigação da influência do tipo de sêmen, se fresco ou congelado, na eficiência reprodutiva do rebanho foi observado que dos 1046 animais que estiveram no estudo 331 não retornaram ao cio (31,6%), sendo 34,8% provenientes de IAC com sêmen fresco e 23,8% de sêmen congelado. O estudo com sêmen fresco revelou uma taxa de não retorno abaixo da média quando do uso desse material em IAC enquanto que no uso do sêmen congelado esta se manteve entre 20 e 30%. Isto pode ser explicado que em ocasião do período de coleta para congelamento, os animais foram mantidos em bom regime de alimentação e de sanidade e aliado a isto houve avaliação da qualidade do sêmen após o descongelamento o que conferiu uma melhor taxa de NR. Também cabe salientar as precárias condições dos carneiros durante o período de inseminação.. A diferença de eficiência entre carneiros e até entre ejaculados de um mesmo carneiro e relatada por vários autores (MAXWELL *et al*, 1997, EPPLESTON, *et al* 1994, WINSOR *et al*, 1997) e isso se confirmou no presente estudo, onde houve comportamentos distintos dos animais quando expostos a fatores externos e concomitantemente submetidos a coletas de sêmen fresco. A manutenção dos animais em boas condições no período de coleta para congelamento e a padronização do sêmen através de análise pós descongelamento fez com que a taxa de NR se mantivesse na média do uso de sêmen congelado., fator também verificado no único animal em que foi possível se comparar o sêmen fresco e o congelado (C101) que manteve a média no sêmen congelado sendo contudo abaixo desta no sêmen fresco

Dos doze carneiros Merino Australiano utilizados no experimento, houve condição de se comparar a eficiência, quando do uso de sêmen fresco em dez animais o que revelou eficiência máxima de 45,4% (35/77) no carneiro 1 e uma mínima de 21,2% (14/66) no carneiro 10, salientando que nenhum dos carneiros teve uma taxa de NR próxima da média para esse tipo de sêmen em IAC, e que é em torno de 70%

O estado nutricional é fator preponderante para que animais de qualquer espécie desempenhem a contendo uma atividade reprodutiva. No presente estudo a condição corporal nível 1, apesar de concentrar o maior numero de animais inseminados (52,5%), foi a condição que obteve a menor taxa de não retorno (29,7%) traduzindo assim a interferência que o estado nutricional das matrizes tem na

performance reprodutiva destas. As ovelhas avaliadas com escore de condição corporal 2 e 3, tiveram um melhor desempenho, visto que na condição corporal 2 se concentraram 40,34% dos estros com taxa de não retorno de 34,1% e a condição corporal 3 apresentou 68 animais em estro (6,5%), com um não retorno de 35,3%. Os animais de condição corporal acima de 3 foram bastante incomuns no rebanho, sendo a condição corporal 4 representada por apenas 7 ovelhas tendo sua totalidade retornada ao cio até o final do experimento. A CC do rebanho também teve influência negativa nas taxas de NR do rebanho mas cabe salientar que quando do uso de sêmen congelado, unicamente a CC3 teve taxa de NR abaixo de 20% enfatizando assim o comportamento homogêneo desse material mesmo em animais com pobre estado nutricional.

Os dois primeiros lotes (L1 e L2) concentraram a maioria das ovelhas inseminadas na propriedade e a partir destes os animais detectados em cio diminuíram muito, o que pode ter sido ocasionado por um decréscimo na atividade de detecção de cio por parte dos rufiões no decorrer dos trabalhos devido as grandes dimensões do potreiro onde se encontrava o rebanho. A eficiência do sêmen fresco se manteve abaixo da média em todos os cinco lotes porém o sêmen congelado chegou a atingir uma taxa de NR de 37,9% (11/29) das ovelhas inseminadas no lote 3 revelando ainda a manutenção da eficiência deste material no decorrer do período de inseminação.

EXPERIMENTO 2 - Avaliação do uso do sêmen congelado em inseminações cervicais após 12 h do início do cio em ovelhas com cio sincronizado e natural.

Neste estudo, após avaliação pela taxa de NR dos 373 animais que estiveram no estudo 155 não retornaram ao cio (41,5%), sendo 57,2% provenientes de IAC com sêmen fresco e 25,8% de sêmen congelado. Apesar do bom estado nutricional dos carneiros e de todo o rebanho, o estudo com sêmen fresco também revelou uma taxa de NR de abaixo da média quando do uso desse material em IAC enquanto que no uso do sêmen congelado esta se situou acima de 25%. Os animais foram mantidos em bom regime de alimentação e sanitários durante todo o período, seja o de coleta para congelamento seja durante a IA e assim cabe se exaltar a importância e a eficiência da avaliação da qualidade do sêmen após o descongelamento o que conferiu uma melhor taxa de NR.

Apenas o carneiro 499 apresentou uma taxa aceitável de NR sêmen fresco de 67,1% (92/137) enquanto que os carneiros C111 e C465 tiveram média abaixo de 40%.

Os dois carneiros doadores de sêmen congelado tiveram média de NR acima de 25%. A influência positiva do estado sanitário e nutricional no desempenho reprodutivo dos animais se traduz quando se compara as taxas de NR entre o sêmen fresco e o sêmen congelado que variou em 12,3% no carneiro C111 e em 13,5% no carneiro C465.

A totalidade dos animais do estudo apresentava as condições nutricionais mínimas ideais, mesmo assim a taxa de NR do sêmen fresco ficou abaixo do esperado (57,2%. A CC2 apresentou a pior taxa com 37,7% (23/61) realçando essa CC como não sendo a mínima para um bom Índice de eficiência Reprodutiva. No sêmen congelado a taxa de NR entre as três CC variou em apenas 7% e no sêmen fresco essa variação foi de apenas 7%.

A taxa de NR foi diretamente proporcional ao andamento da inseminação, alcançando no lote quatro (L4) 57,8%. O primeiro lote da inseminação (L1) concentrou o menor número de ovelhas inseminadas (45/373) com uma taxa de NR de 26,7%. Não houve variação negativa na taxa de NR do sêmen congelado nos lotes, permanecendo entre 19,5 e 30,6%, porém o sêmen fresco chegou a ter 73,8% nos animais do quarto lote(L4).A inseminação foi realizada em dois turnos (manhã e tarde) e obteve-se a mesma porcentagem tanto no número de animais inseminados como na eficiência dos dois tipos de sêmen.

6 CONCLUSÕES

Ao termino dos presentes ensaios concluiu-se que a utilização da técnica de IAC com sêmen ovino congelado na concentração de 200×10^6 é uma forma de reprodução eficiente e de baixo custo, que permite uma fácil disseminação de genética em distintos tipos de rebanhos..

Nas condições em que os experimentos foram realizados é possível concluir que durante a realização de programas utilizando inseminação artificial cervical (IAC), ocorre diferença na eficiência entre carneiros. Porém, a utilização de sêmen congelado, aliada a análise das características deste após os processos de congelamento e descongelamento confere a este tipo de material uma homogeneidade maior se resultados, traduzidos por uma maior eficiência através nas taxas de não retorno (NR). Essa mesma análise permite também que a IAC com sêmen congelado minimize os efeitos negativos que a baixa condição corporal (CC) exerce na eficiência reprodutiva do rebanho.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON BERG, K.; AAMDAL, J. Artificial insemination with frozen semen in ewes at different times of the breeding season. **Reproduction. Domestic Animals**, v. 26, p. 27-30, 1991.
- BELIBASAKI, S.; AMIRIDIS, G. S. et al. Ram seminal plasma and fertility: results from an ongoing field study. **Acta Vet Hung**, v 48, p.335-341, 2000.
- BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Unesp – Campus de Botucatu, São Paulo, 1999.
- BISCARDE, C.A.E.; et al. Taxa de concepção de ovelhas deslanadas inseminadas por laparoscopia com sêmen congelado ou resfriado no semi árido baiano. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, 2007. p. 52.
- COIMBRA FILHO, A. **Técnicas de criação de ovinos**, EMATER/RS, 1985. 92 p.
- COLAS, G., Y. GUERIN, et al. Influence of the photoperiod on the production and fecundity of spermatozoa in the adult Ile-de-France ram. **Reprod. Nutr. Dev.**,v 25, p.101-111, 1985.
- COLAS, G., J. LEFEBVRE, et al. Early prediction of the magnitude of seasonal variations in testicular diameter and percentage of abnormal spermatozoa in Ile-de-France rams. Animals born in February. **Reprod. Nutr. Dev.**,v. 28, p. 589-601, 1988.
- COTRELL, W. O. Ram management for northeastern flocks. **Cornell Veterinary**, v.75, p. 505-511, 1985..
- CUETO, M.I.; GIBBONS, A.E. Eficiencia de la inseminacion artificial com semen congelado em ovinos. **Instituto Nacional de Tecnologia**, EEA, Bariloche, 2002.
- DIAS, M.M. Influência da miíase cutânea primaria escrotal Na produção e qualidade de sêmen de ovinos. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFRGS, 2000. 87 p.
- D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. **Animal Reproduction Science**, v.79, p. 93-102, Italy, (2003).
- DE NAVA, *et al.* Validacion de metodos alternativos de inseminacion articial con semen congelado em lanares. **Ministério de Ganaderia Agricultura y Pesca**, Uruguay, ago. 2003.
- DONAVAN, A. *et al.* Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-Thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal Reproduction Science**, v 84, p. 359-368, 2004.

ELWISBY, A. B.; MIKKAWI, F.E., et al. Some aspects of reproduction in fat-tailed sheep in the subtropics V. Seasonal variation in sexual desire and semen characteristics. **Beitr. Trop. Landwirtschaft Veterinarmed**, v. 14, p.303-311, 1976.

EPPLESTON, J.; MAXWELL, W.M.C. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. **Theriogenology**, Austrália, v.43, p.777-788, 1994.

EPPLESTON, J. **Studies in the fertility of frozen-thawed ram semen**. Ph.D. Thesis, University of New South Wales, Australia, 1992.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney, Butterworths, Austrália, 1987. 194 p.

EVANS, G. Current topics in artificial insemination of sheep. **Australian Journal of Biological Science**, v.41, p.103-116, 1988.

EVANS, G. Current topics in artificial insemination of sheep. **Journal of Biology Science**, Austrália, v. 41, p.103-116, 1988.

FAIR, S.; HANRAHAN, J.P. *et al.* Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, v.63, p.1995-2005, 2005.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R.W. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v.20, p. 684-689, 1983.

FISER, P. S. and R. W. FAIRFULL. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**, v.21, p. 542-551, 1984.

FONSECA, J.F. *et al.* Diferentes doses de dinoprost induzem estro eficientemente no início do ciclo estral de ovelhas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, 2007. p.145.

FUKUI, Y.; ROBERTS, E.M. Repeatability at non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, Austrália, vol 8, 1977.

GIACOMELLI, A.M.; *et al.* Alguns parâmetros reprodutivos de genitais de ovelhas-uma contribuição a biotecnologia da reprodução. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, 2007. p.146.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 54, p. 271-283, 1999.

GONÇALVES, P.B.D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. Editora Rocca, São Paulo, 2008. 387 p.

GOURLEY, D.D.; RIESE, R.L. Laparoscopic artificial insemination in sheep. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract**, v.6, p.615-633, 1990.

GROTTE, O. Artificial insemination with frozen ram semen in Norway. **ICAR**, v.3, 1992.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Editora Manole, 1988.720 p.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, USA, v.66, n. 12, p. 2645-2660, 1983.

KAYA, A., *et al.* Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrossomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. **Reproduction Domestic Animal**, v 36, p.211-215, 2001.

KING, M.E. *et al.* Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without ocytocin administration. **Theriogenology**, United Kingdom, v. 62, p.1236-1244, 2004.

LANGFORD, G. A. Influence of body weight and number of inseminations on fertility of progestogen-treated ewe lambs raised in controlled environments. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1058-1062, 1986.

LUCIDI, P. *et al.* Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. **Theriogenology**, Italy, v.55, p.1797-1805, 2001.

LUZ, L.S.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, n. 2, 2000.

MAXWELL, W.M.C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 10, p. 309-316, 1986.

MAXWELL, W. M.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction Fertil Dev**, v.5, p. 613-638, 1993.

MAXWELL, W. M., G. EVANS, *et al.* Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction Fertility Dev.**, v.11, p. 123-126, 1999.

MEGHAM, C.; RADKLIFFE, W.; LEWIS, G.S. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep, effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. **Theriogenology**, USA, v. 58, p. 1361-1371, 2002.

MEIRA Jr, E.B.S.; et al Avaliação da sincronização de cio com implantes de melatonina exógena como tratamento de fêmeas ovinas de baixa fertilidade. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, 2007. p.84.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 2 v.

MILCZEWSKY, V.; KOZIOCKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade de sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. **Veterinary Science**, Brasil, v. 5, p. 29-33, 2000.

MOORE, R. W. A comparison of electro-ejaculation with the artificial vagina for ram semen collection. **New Zealand Veterinary Journal**, v 33, p. 22-23, 1985.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; JAUME, C.M. O uso da avaliação da condição corporal visando a máxima eficiência produtiva dos ovinos. **Comunicado Técnico**, n. 57, EMBRAPA, 2005.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; JAUME, C.M.; OSÓRIO, J.A.; RIBEIRO, M. Desenvolvimento de processos para uso de sêmen ovino conservado no estado líquido e congelado. **Documentos**, n. 64, EMBRAPA, 2007, 51 p.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; JAUME, C.M. Um sistema para uso do sêmen ovino congelado via cervical superficial. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, 2007. p.147.

MUNHOZ, C.M.; PARRAGUES, V. Efecto del tiempo de IA despues de la deteccion del celo sobre la tasa de preñes em ovinos Corriedale. **Agricultura Técnica**. Chillán, Chile, v. 62, n. 4, 2002.

OLLERO, M., T. *et al*. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. **Int J Androl**, v.19, p. 287-292, 1996.

ORIGEM e domesticação dos ovinos. Bagé: 2009. Disponível em: <<http://www.uniovinos.unipampa.edu.br>>. Acesso em: 04 mar. 2009.

OVINO. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.criaeplantar.com.br>>. Acesso em: 04 mar. 2009.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L. Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. **Veterinary Record**, Noruega, v.156, p. 372-375, 2005.

QUEIROZ, C.F. *et al*. Influencia entre a distância entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen ovino durante o processo de congelamento. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, 2007. p.155.

RABASSA, V. *et al*. Efeitos das técnicas transcervical e laparoscópica sobre as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas a tempo fixo. **Revista Ciência Rural Brasileira**, Brasil, v. 8, n. 1, p. 127-133, 2007.

REBANHO ovino brasileiro- Censo Agropecuário. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 15 jan. 2009.

RIBEIRO, L.A.O. **Produção e doenças de ovinos II**. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação Ciências Veterinárias, Disciplina VET P 122, 2007. Aula Proferida em 22 de agosto de 2007

RIET-CORREA *et al.* **Doenças de ruminantes e equinos**. Editora Universitária, Ufpel, 1998. 658p.

SALAMON, S.; LIGHTFOOT, R.J.. Fertilization and embryonic loss in sheep after insemination with deep frozen semen. **Nature**, London, v. 216, p.194-195, 1967.

SALAMON, S. Fertility after deposition of equal number of frozen-thawed ram spermatozoa by single and double insemination. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 28, p. 477-479, 1977.

SANTIAGO. L.L.; MÂNCIO.; A.B., NOGUEIRA.; E.T. Puberty in Australian Merino ram lambs submitted to nutritional programming during pregnancy and after birth. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, p.109, 2007.

SCHRODER, J., G. E. SWAN *et al.* Effect of ivermectin on the reproductive potential of breeding rams. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 57, p. 211-213, 1986.

SILVA Jr, L.S.; et al Influência da restrição alimentar no desenvolvimento folicular pós parto em ovinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, **Anais**. Curitiba, p.110, 2007.

SOUZA, C.J.H.; Jaume, C.M.; Moraes, J.C.F. Alternativa hormonal para o preparo de rufiões ovinos. **Comunicado Técnico**, n. 56, EMBRAPA, 2005.

WINSOR. D.P. Factors influencing the success of transcervical insemination in merino ewes. **Theriogenology**, Australia, v.43, p.1009-1018, 1985.

WINSOR, D.P. Transcervical artificial insemination in Merino ewes with frozen thawed semen. **Theriogenology**, Australia, v. 42, p.147-157, 1994.

WINSOR, D. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. **Animal Reproduction Science**, Australia, v. 47, p. 21-29, 1997.

WINSOR, D.P. *et al.* Variation between ejaculates in the fertility of ram frozen semen used for cervical insemination in Merino ewes. **Animal Reproduction Science**, Australia, v.47, p.21-29, 1997.

P654u Pinheiro, Carlos Bayard Martins

Uso do sêmen ovino congelado em inseminações artificiais cervicais e fatores que afetam a fertilidade dos rebanhos. / Carlos Bayard Martins Pinheiro. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

46 f. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. José Carlos Ferrugem Moraes, Orient.

1. Inseminação artificial animal: ovinos 2. Fertilidade animal 3. Sêmen congelado: ovinos I. Moraes, José Carlos Ferrugem, Orient. II. Título.

CDD 619.385603

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS