

**Reprodução assistida
e manejo de**

ovinos de corte



**Carmen Iara Mazzoni Gonzalez
José Alexandre Agiova da Costa**

**Reprodução assistida
e manejo de**

ovinos de corte

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Embrapa Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Reprodução assistida e manejo de

ovinos de corte

**Carmen Iara Mazzoni Gonzalez
José Alexandre Agiova da Costa**

*Embrapa
Brasília, DF
2012*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Avenida Rádio Maia, 830 - Vila Popular - Caixa Postal 154

CEP 79106-550 - Campo Grande, MS

Telefone: (67) 3368.2000

Fax: (67) 3368.2150

Home page: www.cnpgc.embrapa.br

E-mail: sac@cnpgc.embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Gado de Corte

Embrapa Caprinos e Ovinos

Comitê Local de Publicações da Embrapa Gado de Corte

Presidente: *Pedro Paulo Pires*

Secretário executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros:

Dalízia Montenário de Aguiar

Davi José Bungenstab

Elane de Souza Salles

Jaqueline Rosemeire Verzignassi

Roberto Giolo de Almeida

Rodrigo Carvalho Alva

Valdemir Antônio Laura

Vanessa Felipe de Souza

Equipe editorial

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Foto da capa: *José Alexandre Agiova da Costa*

Capa, diagramação e tratamento das ilustrações: *Rosane Guedes*

1ª edição

1ª impressão (2012): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Direitos Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte

C 837 Gonzalez, Carmen Iara Mazzoni

Reprodução assistida e manejo de ovinos de corte / Carmen Iara Mazzoni Gonzalez ; José Alexandre Agiova da Costa. – Brasília, DF : Embrapa 2012.

176 p. : il. color. ; 14 cm x 21 cm.

ISBN: 978-85-7035-026-8

1. Ovino de corte – reprodução – manejo. 2. Inseminação artificial. I. Gonzalez, Carmen Iara Mazzoni. II. Título. III. Embrapa Gado de Corte.

CDD 636.08926

© Embrapa 2012

Autores

Carmen Iara Mazzoni Gonzalez

- Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).
- Especialização realizada após o curso de doutorado em Reprodução Assistida de pequenos ruminantes com o Dr. Johan J. Steyn - RAMSEM Bloemfontein AS - África do Sul.
- Coordenadora e executora por período de dois anos de trabalhos de Transferência de Embriões a fresco em ovinos deslanados na Associação de Criadores de Ovinos no Estado de Sergipe.

carmen-gz@hotmail.com

José Alexandre Agiova da Costa

- Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
- Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos em Sistemas Integrados de Produção no Núcleo Regional Centro-Oeste, localizado na Fazenda Modelo da Embrapa Gado de Corte-Terenos/MS
- Membro da Equipe de integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF).

alexandre@cnpqc.embrapa.br

Epígrafe

“Cada homem tem seu lugar no mundo
e no tempo que lhe é concedido.
Sua tarefa nunca é maior que sua
capacidade para poder cumpri-la.
Ela consiste em preencher seu lugar,
em servir à verdade e aos homens.”

João Guimarães Rosa

Dedicatória

Dedicamos este livro aos profissionais das áreas de ciências agrárias que atuam direta e indiretamente no desenvolvimento da ovinocultura de corte brasileira.

*Carmen Iara Mazzoni Gonzalez
José Alexandre Agiova da Costa*

Agradecimento

Agradecemos o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Embrapa Gado de Corte ao estímulo mútuo entre os autores na elaboração do conteúdo técnico dessa obra.

*Carmen Iara Mazzoni Gonzalez
José Alexandre Agiova da Costa*

Prefácio

A criação de ovinos é uma prática bastante antiga e estes animais acompanham o homem desde a antiguidade. Mas o consumo da carne ovina, no Brasil, é baixo se comparado ao de outros países, e ainda assim a produção de ovinos em nosso país não atende à demanda do consumo existente.

Esta é uma atividade que vem evoluindo gradativamente no país, mudando o foco e crescendo em regiões onde antes a ovinocultura era insignificante. A ovinocultura passou inclusive a viabilizar sistemas de produção animal em pequenas propriedades, sendo uma alternativa em sistemas integrados de produção – como o agrossilvipastoril – e tornando-se mais uma alternativa de investimento no agronegócio.

Esta obra contempla desde a fisiologia básica da reprodução, até os aspectos mais aplicados da biotecnologia da reprodução na espécie ovina, passando por temas de importância em seu manejo reprodutivo, como ultrassonografia para diagnóstico de gestação, o manejo nutricional e sanitário, a estação de monta, a inseminação artificial, a indução e/ou sincronização de estro e a transferência de embriões. É um esforço para auxiliar os produtores de ovinos, ou interessados na criação destes animais, com informações de fácil acesso, porém baseadas no rigor científico de pesquisadores com larga experiência no trato com estes animais.

Este livro traz aos produtores e profissionais que atuam com esta espécie um conjunto de informações valiosas que irá auxiliar a ovinocultura a enfrentar os desafios de sua expansão, com excelência na criação e aumento dos seus índices reprodutivos e produtivos.

Ériklis Nogueira
Pesquisador em Produção e Reprodução Animal
Embrapa Pantanal

Sumário

REPRODUÇÃO

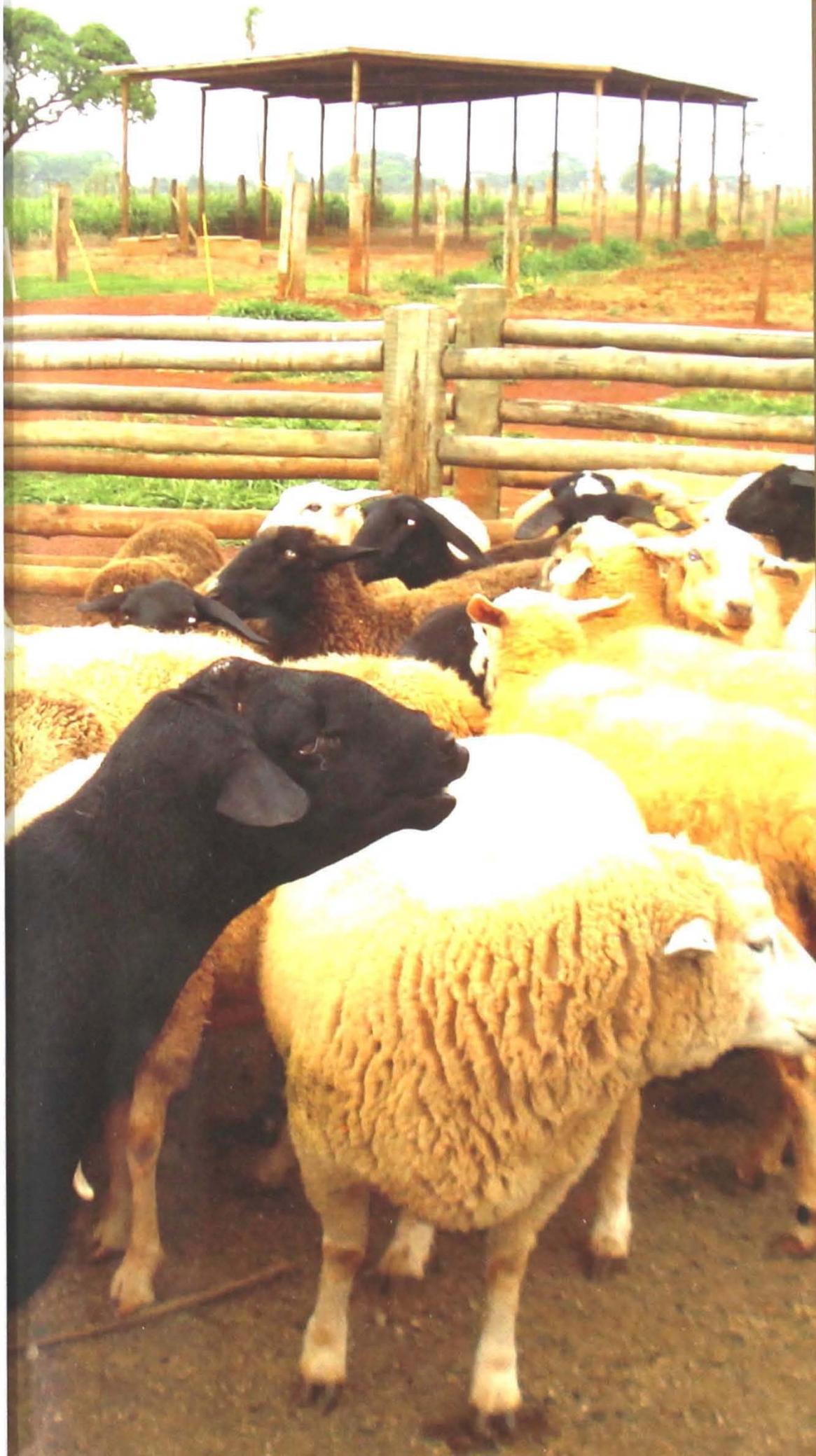
- 1 Perfil reprodutivo dos ovinos, 1
- 2 Índices de produtividade do rebanho, 27
- 3 Princípios da manipulação farmacológica do ciclo estral, 33
- 4 Bioestimulação sexual pelo *efeito macho*, 41
- 5 Inseminação artificial (IA), 47
- 6 Transferência de embriões (TE), 57
- 7 Congelação de sêmen, 87

NUTRIÇÃO

- 8 Fatores nutricionais associados à reprodução, 109
- 9 Nutrição de doadoras e receptoras, 121
- 10 Nutrição e manejo dos reprodutores em serviço, 125

REPRODUÇÃO

- 11 Manejo das receptoras inovuladas, 131
 - 12 Manejo sanitário dos animais, 139
 - 13 Diagnóstico de gestação por ultrassonografia via transretal, 143
- Referências, 148



REPRODUÇÃO

Perfil reprodutivo dos ovinos



Características fisiológicas sexuais dos ovinos

Na espécie ovina (*Ovis aries*) a atividade sexual se expressa geralmente quando o fotoperíodo diminui, ou seja, após o solstício de verão, que ocorre em 21/22 de dezembro. Os sinais luminosos são captados pelos fotorreceptores dos olhos, transmitidos pelo sistema nervoso central para o hipotálamo e depois para a glândula pineal. Esta converte o sinal nervoso em um sinal hormonal, o qual apresenta a característica de um ritmo circadiano de secreção de melatonina (SÁ, 2002).

Na presença da luz, a secreção deste hormônio é inibida e sua liberação é desencadeada por um ciclo circadiano de luz-obscuridade. Este ciclo da melatonina pode ser interpretado como sinais indutivos ou supressivos. Os sinais indutivos estimulam o pulso gerador de LH, diminuindo a ação do estrogênio e os supressivos inibem o pulso gerador tornando-o mais sensível à ação do estrogênio (KARSCH, 1984).

Desta forma, o início da atividade reprodutiva destes animais ocorre através do reconhecimento pelo seu eixo hipotalâmico das variações do comprimento horas/luz. Nas fêmeas, o desencadeamento do estro e ovulações é acionado quando o comprimento de horas luz atinge o seu máximo, no final do verão, e no equinócio de outono, que acontece em 20/21 de março (LYNCH et al., 1992).

Os ovinos oriundos de países com clima temperado, onde as estações do ano são bem definidas e têm latitudes médias entre 20°C e 40°C ou superiores, apresentam comportamento sexual como poliétricos estacionais. Entretanto, as fêmeas ovinas originárias de regiões próximas à linha do Equador tendem a ciclar ao longo do ano, apresentando reduzido ou nenhum índice de estacionalidade sexual.

No Brasil, as ovelhas pertencentes às regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste podem ser classificadas como poliétricas contínuas, sendo satisfatório o estímulo de sua atividade cíclica frente aos recursos naturais. O método mais utilizado e altamente eficaz é o emprego do *efeito macho* (estimulação sexual da fêmea pela presença do macho) para a prática da monitoração anual da frequência do ciclo estral. A ocorrência regular e constante desse evento fisiológico constitui um critério importante de mensuração da eficiência reprodutiva do tipo de ovino explorado, visando a produção comercial (COELHO, 2001).

Embora o carneiro sofra influência de fotoperíodo, sua reação é diferente da que ocorre com a ovelha. O aumento do diâmetro testicular tem início ainda no fotoperíodo crescente e o efeito maior acompanha a fase decrescente da luminosidade. A explicação deste fato biológico é fundamentada na seguinte hipótese: enquanto a existência de folículos no ovário da fêmea durante o anestro permite rápida maturação e ovulação, a formação espermática e a ejaculação de um carneiro emergente da estação sazonal nunca se realizam em um período inferior a dois meses. Em condições naturais, o carneiro apresenta um ciclo de peso testicular por ano. Os animais oriundos de regiões tropicais ou subtropicadas têm a capacidade de desempenhar a atividade sexual em todos os meses do ano. Neste caso, os fatores nutricionais, sanitários e a temperatura apresentam estreita relação com o contínuo potencial viável espermático (HAFEZ, E.; HAFEZ, B, 2004).

Endocrinologia reprodutiva da fêmea

Ciclo estral

O ciclo estral compreende as alterações fisiológicas e comportamentais apresentadas pela fêmea sob influência do metabolismo hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em tempo determinado. Na fêmea ovina este evento ocorre em intervalos de 14 a 19 dias, com média de 17. Pode ser dividido em duas grandes fases dominadas pelas estruturas presentes nos ovários durante cada uma: fase lútea e fase folicular. A fase luteal começa no dia dois (estro = dia zero) e se estende aproximadamente até o dia 13, e a fase folicular inicia no dia 14 do ciclo estral. Nos ovinos o desenvolvimento folicular ocorre em ondas e a emergência destas está determinada pelo hormônio folículo estimulante (FSH). Existe uma refinada regulação parácrina ovariana que atua junto com o FSH para determinar o número de folículos recrutados e quais irão continuar o desenvolvimento. A elevação nas suas concentrações plasmáticas é observada no intervalo de um a dois dias antes de cada onda. O pico do hormônio luteinizante (LH) conduz à ovulação do folículo pré-ovulatório e da estrutura folicular remanescente, ocasionando a formação do corpo lúteo (MORELLO; CHEMINEAU, 2004).

Enquanto o corpo lúteo se desenvolve, as concentrações de progesterona plasmática aumentam. Esta, quando secretada durante a

fase luteal, desempenha os seguintes papéis durante o ciclo estral: realiza um “priming” sobre os centros comportamentais do cérebro, de maneira que o estro seja manifestado por uma elevação posterior dos estrógenos na fase folicular; modulam o desenvolvimento folicular de maneira que o próximo pico de LH induza à formação de um corpo lúteo normal e inibe a secreção endometrial da prostaglandina $F_2\alpha$ nos primeiros dias da fase luteal (HAFEZ, E.; HAFEZ, B, 2004).

A elevação da progesterona plasmática reduz a frequência de pulsos de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), inibindo a secreção tônica de LH, sendo este também regulado por produtos foliculares como os estrógenos e a inibina (FRANDSON et al., 2005).

Durante a fase lútea, as concentrações de FSH devem ser suficientes para assegurar que existam folículos capazes de iniciar a fase final do desenvolvimento pré-ovulatório se as secreções tônicas e pulsos de LH aumentarem. Entre os dias 11 e 12 do ciclo, é ativado o mecanismo de retroalimentação positivo, $PGF_2\alpha$ /oxitocina luteal endometrial, o que acarreta a lise do corpo lúteo. Ocorre uma queda brusca da progesterona plasmática por volta do dia 13, este fato permite o aumento dos pulsos de GnRH e LH, proporcionando o estímulo na secreção de estradiol pelo ovário, que estimula o comportamento de estro e os aumentos pré-ovulatórios de GnRH e LH (HAFEZ, E.; HAFEZ, B, 2004).

O aumento de LH induz a ovulação e a luteinização, o que diminui a secreção de estradiol, iniciando-se um novo ciclo. Entretanto, a taxa ovulatória também é determinada por fatores genéticos, nutricionais e relações endócrinas entre folículos intra e interováricos que, entre outras causas, determinam a sensibilidade ao FSH (GINTHER et al., 1995).

A Tabela 1-1 apresenta o período, a duração, as alterações fisiológicas e comportamentais de cada fase do ciclo estral.

Estro

É o período que a fêmea aceita a cobertura. Os principais sintomas apresentados pela fêmea ovina são: inquietação; procura e segue o reprodutor; apresenta a vulva edemaciada e congestionada; presença vaginal de muco com aspecto cristalino; e pode ocasionalmente montar as outras fêmeas.

TABELA 1-1. Períodos, duração, alterações fisiológicas e comportamentais do ciclo estral na ovelha.

FASE FOLICULAR					
PERÍODO	DURAÇÃO (DIAS)	HORMÔNIOS ATUANTES	OVÁRIO	VAGINA E VULVA	COMPORTAMENTO
Proestro	2,5	LH FSH Estrógenos	Corpo lúteo em regressão. Máximo desenvolvimento do folículo pré-ovulatório.	Pouca secreção vaginal. Mucosa vulvar com coloração normal.	Fêmea inquieta busca o carneiro.
Estro	1 – 2 (± 30h)	Descarga pré-ovulatória de LH entre 6 a 12 horas após iniciado o estro.	Ovulação (24 a 30 horas de iniciado o estro)	Vagina com secreção copiosa de muco. Vulva com mucosa congestionada.	Fêmea fica parada e aceita a monta.
FASE LÚTEA					
PERÍODO	DURAÇÃO (DIAS)	HORMÔNIOS E SUBSTÂNCIAS LUTEOLÍTICAS ATUANTES	OVÁRIO	VAGINA E VULVA	COMPORTAMENTO
Metaestro	2 - 4	Aumenta a secreção de progesterona.	Formação de um novo corpo lúteo. Desenvolvimento de ondas foliculares.	Vagina com epitélio pálido. Vulva com aspecto normal.	Fêmea inativa.
Diestro	4 - 13	Progesterona FSH e PGF ₂ α	Corpo lúteo funcional. Desenvolvimento de ondas foliculares.	Vagina com epitélio pálido. Vulva com aspecto normal.	Fêmea inativa.

Fonte: Morello; Chemineau, (2004)

Legenda: FSH - Hormônio Folículo Estimulante; LH - Hormônio Luteinizante; PGF₂α - Prostaglandina F₂α - substância de ação luteolítica

Anestro

É o período que se caracteriza pela ausência de ovulações e frequência de ciclos estrais regulares. Este evento pode ser fisiológico devido à sazonalidade em animais oriundos de regiões de clima temperado ou devido a distúrbios nutricionais e sanitários.

Durante o anestro estacional, a inter-relação entre o eixo hipotalâmico-hipofisário e o estrógeno secretado por um folículo em crescimento é negativa. A atividade ovariana continua, entretanto, por falta do pico de LH, não ocorre a cascata desencadeante da ovulação. Como o fenômeno é controlado pelo fotoperíodo, a melatonina é secretada pela glândula pineal durante as horas de escuridão, e o aumento do tempo de secreção determina uma modificação na sensibilidade deste eixo ao hormônio estrogênico (LYNCH et al., 1992).

Desta forma, o folículo dominante de uma onda não poderá ovular enquanto os fatores extenorreceptivos inibitórios (relação luz/escuridão e sua tradução endócrina) mantiverem um comando de “feedback” negativo entre os estrógenos e o eixo hipotalâmico-hipofisário. As demais inter-relações endócrinas e as que controlam a dinâmica folicular também estão suprimidas (VIU et al. 2006).

Em animais alocados em regiões tropicais, onde não ocorre o efeito da estacionalidade, o anestro pode ser ocasionado por influência do meio ambiente adverso, como a escassa disponibilidade de alimentos, problemas sanitários, manejo reprodutivo incorreto e período pós-parto.

Endocrinologia reprodutiva do macho

A primeira liberação de espermatozoides móveis e viáveis ocorre após a maturidade sexual do macho, na fase da puberdade. Entretanto, o processo da espermatogênese inicia-se durante a vida fetal, quando são produzidas as espermatogônias, originárias de células primordiais, que sofrem divisões e tornam-se espermatozoides imaturos. Durante a puberdade, as células espermáticas amadurecem e migram para os túbulos seminíferos, sendo este processo conhecido como ciclo espermatogênico, que no ovino ocorre em torno de 40 dias. Todo este processo acontece sob influência do metabolismo hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. São duas as gonadotrofinas liberadas pelo eixo hipotalâmico. A primeira é o hormônio luteinizante (LH), que tem atuação nas células de

Leyding – localizadas nos testículos –, responsáveis por estimular a produção do hormônio testosterona. Este atua nos túbulos seminíferos para promover a espermatogênese. A segunda, o hormônio folículo estimulante (FSH), age na célula de Sertoli estimulando a espermatogênese (HAFEZ, E.; HAFEZ, B, 2004).

Puberdade e maturidade sexual

Na fêmea, a puberdade é a idade em que os animais começam a expressar as características sexuais secundárias. A puberdade fisiológica compõe um mecanismo hormonal, que é acionado pelo gatilho do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, ocasionando o recrutamento, crescimento e maturação de folículos até ao evento da ovulação. Contudo, sem observação clínica de estro, sendo este visualizado somente a partir do segundo ciclo. A maturidade sexual é a condição em que os indivíduos apresentam-se física e sexualmente desenvolvidos, com capacidade de reprodução e no início de sua etapa produtiva. Zootecnicamente, considera-se esta fase é o momento em que os animais atingem peso vivo em torno de 60% a 75% de uma fêmea adulta (HAFEZ, E.; HAFEZ, B, 2004).

No macho, o início da puberdade pode ser avaliado pelo desbrida-mento peniano, considerando-se púbere o animal que apresentar a parte livre do pênis totalmente despreendida da mucosa interna do prepúcio. Por ocasião da constatação deste fato, os animais deverão apresentar espermatozoides maduros no ejaculado, sob o comando hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O comportamento sexual com exteriorização da libido pode ocorrer a partir dos seis meses de idade. O início da sua vida reprodutiva é recomendado a partir dos dez meses até um ano, quando estão atingindo a maturidade sexual e apresentarem condicionamento físico satisfatório para a realização das coberturas. A partir de dois anos de idade, o animal atinge a fase adulta (DELGADILLO, 2004).

Manejo reprodutivo

O manejo reprodutivo dos ovinos pode ser conduzido conforme as seguintes recomendações técnicas, as quais seguem a avaliação dos critérios a seguir (PILAR et al. 2002).

Seleção das fêmeas

Para a formação de um rebanho base de fêmeas adultas primíparas e múltiparas, as mesmas devem ser selecionadas conforme os seguintes critérios de classificação: histórico positivo da ocorrência de partições fisiológicas; histórico negativo da ocorrência de abortos e aparecimento de ciclos estrais irregulares; conhecimento comprovado da habilidade materna; apresentação de boa condição de higidez; condição nutricional satisfatória, com escore corporal três, sendo esta mensurada pela avaliação da espessura de gordura que cobre os processos dorsais e os transversais, conforme preconizado por Russel et al. (1969) (ver Capítulo 8); não utilizar fêmeas com idade acima de sete anos; descartar ovelhas que apresentem defeitos genéticos, como o agnatismo, prognatismo e hérnias; somente utilizar fêmeas com correta inserção de úbere, apresentando os dois tetos funcionais.

Sendo, o manejo reprodutivo um dos segmentos iniciais da cadeia de produção e de importância vital para o incremento da produtividade animal, o seu controle pode ser conseguido com o emprego das seguintes normas práticas e racionais: distribuição das fêmeas em dois grupos distintos, o primeiro composto por ovelhas primíparas e múltiparas, e o segundo composto por ovelhas nulíparas; zootecnicamente a idade recomendada para o primeiro acasalamento é a partir de oito meses de idade, com animais apresentando 25kg a 35kg de peso vivo, isto é, quando as fêmeas jovens apresentarem em torno de 60% a 75% do peso de uma fêmea adulta.

O manejo reprodutivo racional recomenda a separação por sexo a partir dos quatro meses de idade, impedindo a ocorrência de coberturas indesejáveis que comprometam a evolução da atividade reprodutiva futura desta fêmea. Sempre que possível, colocar em cobertura as fêmeas nulíparas com os reprodutores mais jovens; não utilizar reprodutores que estejam em repouso sexual prolongado, em função do ejaculado neste caso apresentar espermatozoides com defeitos patológicos próprios da não ativação da espermatogênese e que interferem negativamente na fecundação.

Seleção dos machos

Os critérios adotados para a seleção dos reprodutores são os seguintes: constatação da saúde geral; integridade dos sistemas locomotor, visual e digestivo; e exame clínico andrológico. Outro critério de

avaliação é a capacidade de serviço, que avalia o desejo sexual ativo (libido) dos machos. Os carneiros destinados para as coberturas não devem ser portadores de doenças infecto-contagiosas, metabólicas e defeitos genéticos. Observar o desenvolvimento corporal que deve ser compatível com a idade e o padrão racial.

O emprego intensivo de carneiros para monta natural e/ou como doador de sêmen impõe a prática rotineira de exames clínicos andrológicos como critério para a seleção destes, sendo que a qualidade do ejaculado e a libido representam características inerentes aos indivíduos. Este procedimento é executado em duas etapas.

A primeira é o exame clínico dos testículos. Neste, deve ser constatada a ausência das seguintes alterações: criptorquidismo, orquite, assimetria testicular, hipoplasia, sensibilidade exacerbada durante a palpação e consistência flácida. Os testículos devem ter forma anatómica de ovoides, consistência túrgida elástica, estarem em posição vertical e apresentar mobilidade dentro da bolsa escrotal. Não podem apresentar processos inflamatórios ou feridas. Verificar possíveis alterações no pênis e prepúcio. A mensuração da circunferência escrotal é outro critério de suma importância porque constitui fator de correlação positiva com a produção espermática, capacidade de serviço e desenvolvimento sexual, indicando sua utilização como mecanismo seletivo de ovinos (MOURA et al., 1999). Esta medida deve ser aferida com uma fita métrica e pode ser dividida pela categoria corporal do animal (Figura 1 - BITTENCOURT et al. 2004).

A segunda etapa é a avaliação das características físicas do sêmen. Para isto, o ejaculado pode ser colhido em tubo graduado, utilizando-se eletroejaculador, e este deve ser mantido em banho-maria a 37°C durante o período em que estiverem sendo realizadas as análises físicas (EVANS; MAXWELL, 1990).

Após o exame andrológico, deve ser estabelecido um regime regular de colheitas de sêmen a intervalos de 15 dias. Este procedimento tem por finalidade a ativação da espermatogênese, finalizando o descanso sexual dos carneiros e, desta forma, preparando-os para um trabalho sexual intensivo durante o período das coberturas em torno de 42 a 90 dias, com produção espermática dentro da normalidade.

Os reprodutores aprovados no exame andrológico devem ser submetidos à avaliação da libido, que deve ser ativa quando estes estiverem na presença de fêmeas em estro. Esta característica reprodutiva é de suma importância no macho, pois apresenta alto grau de herdabilidade genética.



Número de animais	Idade (meses)	Categoria (C)	Médias (cm)
415	4-6	C1	28,44±3,77
	6-8	C2	31,41±2,49
	8-10	C3	32,26±1,76
	10-12	C4	32,86±2,39
	12-15	C5	33,43±2,33
	15-18	C6	33,33±2,67
	18-24	C7	34,38±2,60
	24-30	C8	34,65±2,21
	30-36	C9	35,04±1,85
	Acima de 36	C10	36,19±2,80

Fonte: Bittencourt et al. (2004)

▼ **FIGURA 1-1.** Média da circunferência escrotal mensurada de carneiros Santa Inês entre os anos de 2002 e 2004 no estado da Bahia.

Teste de capacidade de serviço

O teste de capacidade de serviço consiste em uma medida do número de serviços que um reprodutor ovino efetua sob condições determinadas de avaliação. Ele representa uma característica com relação estreita ao desejo sexual (libido) e à capacidade de cobertura, a qual significa a capacidade física do macho para executar o serviço de monta. O alto potencial produtivo e reprodutivo de um carneiro pode tornar-se irrelevante se o mesmo não apresentar capacidade de identificar e servir as fêmeas em condições sexuais receptivas. Entretanto, apesar de sua importância, este teste não é utilizado nas fazendas e no comércio de carneiros de interesse zootécnico.

O cercado utilizado para essa avaliação pode medir em torno de 3 m x 5 m. Os animais a serem testados devem ser perfeitamente visualizados pelo pessoal de apoio responsável pelos animais. Introduce-se o carneiro neste cercado com duas a quatro fêmeas com sinais evidentes de estro natural, ou induzido por fármacos, por um período de 20 a 40 minutos. Deve ser monitorado e registrado todo o comportamento do reprodutor, desde o cortejo sexual até o número de coberturas efetuadas. Esse teste é o que melhor prediz

QUADRO 1-1. Avaliações

1. Avaliações realizadas em leitura e visualização direta no ejaculado obtido no copo coletor:
 - 1.1. Volume – expresso em mL.
 - 1.2. Aspecto – relacionado com a concentração espermática e a consistência do ejaculado varia de cremoso fino a cremoso marmóreo.
 - 1.3. Cor – apresenta-se como branca leitosa ou perolada.
2. Avaliações realizadas com o auxílio de microscópio ótico binocular:
 - 2.1. Movimento de massa – relacionado com a concentração e o movimento de ondas do total de células espermáticas, classificado em escore de zero a cinco. O valor mínimo aceitável é três.
 - 2.2. Motilidade progressiva individual – é o movimento progressivo individual dos espermatozoides que atravessam o campo quando, avaliados em amostra disposta entre lâmina e lamínula e expresso em porcentagem. O valor mínimo aceitável é 70%.
 - 2.3. Vigor – significa força de propulsão que o espermatozoide impõe na sua motilidade individual e é expressa em escore de zero a cinco. O valor mínimo é três.
 - 2.4. Concentração espermática – é total de espermatozoides contidos no ejaculado e expresso em bilhões ($\times 10^9$). O valor mínimo aceitável é em torno de um bilhão.
 - 2.5. Morfologia espermática – é a constatação de células espermáticas anormais e divididas em defeitos maiores e menores; deve ser feito esfregaço da amostra de sêmen, corada e leitura em microscopia ótica comum ou confeccionada em preparação úmida para leitura em microscópio de contraste de fase. O valor máximo é 10% para os defeitos maiores e 20% para os menores e 20% no total.

a libido de um reprodutor. Ele determina a proporção exigida de **carneiro:ovelha** do rebanho. Os animais adultos que cobrem quatro a seis ovelhas, ou mais, durante 30 minutos são os selecionados; e os que cobrem duas ou três fêmeas durante este período são os classificados como aceitáveis (PUGH, 2005).

Medidas importantes com os animais no período pré-reprodução

A organização da estação reprodutiva deve ser fundamentada nos seguintes critérios: cumprir mensalmente o calendário sanitário geral; oferecer aos animais alimentação energética-proteica equi-

QUADRO 1-2. Modelo de ficha para exame andrológico

- A. Identificação do animal
 - 1. Nome
 - 2. Número de Registro
 - 3. Raça
 - 4. Data de nascimento
- B. Exame clínico – avaliação da condição corporal e sanitária do animal
- C. Sistema genital externo
 - 1. Prepúcio – presença de ferimentos
 - 2. Pênis – integridade e deve estar livre dentro do prepúcio
 - 3. Circunferência escrotal – expressa em cm
 - 4. Testículos – avaliar por palpação e visualização
 - 4.1. Simetria
 - 4.2. Posição
 - 4.3. Formato
 - 4.4. Consistência
 - 4.5. Mobilidade
 - 4.6. Sensibilidade
 - 5. Epidímo – avaliar por palpação e visualização
 - 5.1. Cabeça
 - 5.2. Corpo
 - 5.3. Cauda
 - 6. Cordão espermático – avaliar por palpação e visualização
- D. Espermiograma – Características físicas do ejaculado
 - 1. Volume – expresso em mL
 - 2. Cor
 - 3. Aspecto
 - 4. Movimento de massa – expresso em escore de zero a cinco
 - 5. Motilidade progressiva individual – expresso em porcentagem
 - 6. Vigor – expresso em escore de zero a cinco
 - 7. Concentração espermática – expresso em ($\times 10^9$)
 - 8. Morfologia espermática – expresso em porcentagem
- E. Conclusão – se aprovado ou reprovado
- F. Período de validade do certificado emitido – não superior a 60 dias

librada, enriquecida de vitaminas e minerais; manter a seleção, descartando anualmente as fêmeas com baixa fertilidade, desprovidas de habilidade materna, alta carga parasitária e que tenham dificuldade de parição, além do descarte de machos sem libido; ter em ordem a escrituração zootécnica do rebanho; a escolha da época de concentração das partições deve ser racional, avaliando-

se o melhor período de disponibilidade de forragens, visando uma boa manutenção corporal das ovelhas para a sua boa produção de leite e manutenção para obtenção do melhor manejo das crias e sua terminação o mais precoce possível; as instalações devem ser cuidadosamente adequadas em função do período eleito, se seco ou chuvoso; dispor de mão de obra contínua para o controle das coberturas e o manejo diário dos cordeiros; e o manejo geral dos animais.

A primeira medida sanitária a ser tomada com o rebanho deve ser o controle de infestação por endoparasitas, com auxílio de exames de fezes, para a mensuração da quantidade de ovos por grama e a identificação da espécie do parasita incidente. As vermifugações devem ser estratégicas, com a administração de princípios ativos eficazes conforme o caso clínico. O grau da carga parasitária de larvas infectantes nas pastagens está basicamente relacionado com dois fatores climáticos, umidade e temperatura, sendo os períodos de seca e chuva diferentes nos ambientes de clima tropical e temperado. Desta forma, o controle deve ser executado conforme as características de cada macro ou micro região do Brasil.

Um calendário de vacinação preventiva deve ser seguido contra a ocorrência de clostridium, linfadenite caseosa, raiva e, dependendo do conhecimento da frequência de surtos, contra leptospirose.

Os animais devem ser pesados mensalmente até o início da estação de monta e classificados pelo escore corporal para que se forneça suplementação nutricional e mineral aos animais de baixo escore corporal antes da mesma. As ovelhas devem estar ganhando peso durante todo o período de acasalamento. As fêmeas que ganham peso antes e durante o período de acasalamento melhoram a taxa de fertilidade, resultando em menor número de ovelhas "falhadas" e o aumento no índice de partos gêmeos.

Estação de monta com estro natural

A estação de monta é o período em que ocorre a concentração das coberturas em um determinado intervalo de tempo através de estímulos visuais, olfatórios e hormonais. Nesse sistema, o emprego do efeito macho na fisiologia reprodutiva dos ovinos está relacionado à antecipação e sincronização da manifestação da puberdade à sincronização de estros com ovulação em ovelhas durante o anestro estacional. Isso acontece porque, na presença do macho, ocorre um

aumento nos níveis plasmáticos do hormônio luteinizante (LH) e/ou maior sensibilidade aos estrógenos dentro de um período de 20-40 horas ao pico de LH (DRYMUNDSON, 1976; MARTIN et al., 1986). No entanto, condições sanitárias, nutricionais e a raça apresentam importância vital no percentual de ovelhas em anestro fisiológico que respondem ao efeito macho (WRIGHT et al., 1990).

As questões climáticas são fatores críticos que exigem avaliação para a escolha do período para os acasalamentos. Estes, quando realizados em períodos de temperatura muito elevada, ocasionam repercussão negativa na fertilidade dos animais, podendo afetar a ovulogênese e a espermatogênese e até ocorrer altas taxas de reabsorção embrionária.

A estação de monta pode ser de curta duração, de 42 a 50 dias, sendo dividida em dois períodos. O primeiro será de sete (7) dias e tem a finalidade de promover o *efeito macho*. O mecanismo deste é desencadeado pela ação dos chamados feromônios que transmitem a informação sensorial ao sistema olfativo das fêmeas, onde são interpretadas por receptores químicos. Acionam a liberação de LH pela hipófise anterior e por estímulos visuais relacionados à presença física dos machos. Esta estimulação e concentração da atividade sexual das ovelhas deve ser pela introdução no rebanho de 10% de machos rufiões em intervalos de 12 horas. A estimulação promovida por estes é eficaz apenas quando as fêmeas permanecerem no mínimo 15 dias isoladas de contato visual e olfativo com reprodutores ou rufiões. A ovulação após este procedimento ocorre entre 24 a 60 horas (CHEMINEAU; COGNIÉ, 1984).

No rebanho de fêmeas que estão ciclando, exteriorizando sinais clínicos de estro e ovulando, ocorre também o *efeito fêmea*. A estimulação sexual de uma fêmea em outra apresenta eficácia inferior, quando comparada ao *efeito macho*. Entretanto, pode ser observado um percentual em torno de 36% nos primeiros cinco dias e 6% no decorrer de dez dias, de fêmeas que exteriorizam estro, estimuladas por outras em atividade sexual ativa no mesmo lote (MORELLO; CHEMINEAU, 2004).

O segundo período terá duração de 42-43 dias. O estabelecimento deste tempo tem por objetivo a chance de cobertura das fêmeas em dois estros consecutivos, uma vez que, a frequência do ciclo estral ocorre em até 21 dias.

Em determinados rebanhos de ovinos de origem europeia, a existência ou não de algum tipo de fator ambiental ou nutricional que

possa levar a efeito sazonal na atividade cíclica dos animais na estação de monta pode alongá-la ficando em torno de 90 dias. Entretanto, em borregas de origem europeia no primeiro acasalamento observa-se uma estação de monta 25% a 30% mais curta do que para as fêmeas adultas, devido à influência natural do fotoperíodo (VILELA FILHO; FIGUEIRÓ, 1994).

À medida que as fêmeas exteriorizarem sinais clínicos de estro devem ser expostas aos carneiros selecionados diariamente nos turnos da manhã e da tarde, a intervalo de 12 horas, até o momento em que não mais os aceitem. Alguns cuidados devem ser seguidos como: proporção sexual = **1 carneiro: 40 ovelhas** para os machos aptos no teste de capacidade de serviço. Manter um rodízio de reprodutores, com cuidado especial de trocar os lotes entre os mais jovens e os mais velhos, e para este procedimento ter 4% de reprodutores reservas. A cobertura das fêmeas deve ser realizada em dois lotes distintos, o lote das nulíparas e o das primíparas ou múltiparas. Este cuidado é importante porque as fêmeas jovens apresentam ovários menores, taxas de ovulações mais baixas, estros mais curtos e ciclos estrais irregulares.

Outro fator importante com relação às ovelhas jovens, o qual pode contribuir para a redução da taxa de fertilidade, é a inexperiência destes animais. Elas não procuram o macho e, ocasionalmente, relutam em aceitá-lo

Estação de monta com estro sincronizado com fármacos

A desestacionalização da atividade reprodutiva ou a intensificação do manejo é de grande interesse e indispensável na utilização da monta natural controlada intensiva, independentemente da época do ano que exija maior ou menor aporte alimentar e da ocorrência de problemas sanitários inerentes aos períodos de seca ou chuva extremos.

A monta natural pode ser programada nos meses mais favoráveis, mediante indução hormonal de estro e horários pré-fixados para a realização dos acasalamentos; ou em programas de cruzamentos, para o estudo do desenvolvimento corporal, rusticidade e rendimento de carcaça dos produtos nascidos (MORAES et al., 2002).

A efetiva, e de baixo custo, sincronização de estro em pequenos ruminantes em estações de coberturas pode ser obtida pelo uso

de pessários vaginais impregnados com progestágenos associado à administração intramuscular de Gonadotrofina coriônica equina (eCG), que aumenta a ocorrência e a velocidade de ovulação, além de favorecer a fertilidade.

Os pessários vaginais são confeccionados com esponjas de poliuretano de alta densidade e impregnadas com dois tipos de progestágenos, o MAP (acetato de medroxi-progesterona) na dose de 50 mg ou o FGA (acetato de fluorogestona) na dose de 40 mg. O princípio básico dessa associação hormonal consiste em provocar a ovulação e formação de um corpo lúteo ou luteinização do folículo dominante. A permanência dessas esponjas na porção cranial da vagina pode ser longa, entre 11 e 14 dias, ou curta, em torno de 5 e 6 dias, ficando a decisão a critério do Médico Veterinário. A dose do eCG pode ser entre 300 a 400UI (ROMANO et al., 2000; LIMA et al., 2005). A identificação do estro deve ser por uso de machos rufiões e as coberturas executadas com intervalo de 12 horas, desde o início até a não mais exteriorização deste sintoma pelas fêmeas.

A Tabela 1-2 apresenta os resultados de fertilidade, prolificidade e tipo de parto obtidos do cruzamento de ovelhas da raça Santa Inês com carneiros das raças Damara e Dorper. As fêmeas foram submetidas à sincronização de estro com aplicação de protocolo longo, associação da colocação de pessário vaginal de poliuretano impregnado com 50 mg de MAP e administração parenteral de 400UI de eCG.

Outro método que pode ser utilizado para a sincronização de estro concentrando o período das montas naturais e o das parições é a administração de prostaglandina $F_2\alpha$. Em função de esta substância

TABELA 1-2. Resultados obtidos de monta natural controlada com sincronização de estro, com intervalo de 12 horas para início da monta (OCIM) e sem intervalo de monta (OSIM).

TRATAMENTOS	OVELHAS COBERTAS		OVELHAS PRENHES		TIPO DE PARTO						PROLIFICIDADE
	Nº	%	Nº	%	Nº			%			
					S	D	T	S	D	T	
OCIM	19	100	13	73,7	08	05	00	61,5	38,5	0,0	1,38
OSIM	11	100	09	81,8	07	01	01	77,8	11,1	11,1	1,33

Fonte: Gonzalez et al.(2006b)

Legenda: **N** = Número; **%** = Percentual; **S** = Simples; **D** = Duplo; **T** = Triplo

possuir ação luteolítica, sua aplicação fica limitada em ovelhas que estejam em atividade sexual, no período de cinco a 14 dias do ciclo e apresentem um corpo lúteo funcional. Desta forma, o seu uso depende da identificação precisa do início do estro para uma única aplicação, ou, não sendo possível este controle, devem ser duas aplicações. A dose recomendada varia de 25 µg a 50 µg, aplicadas por via sub-mucosa vulvar ou intramuscular.

Emprego intensivo da estação sexual

A eficiência reprodutiva de um rebanho ovino está diretamente relacionada ao número de cordeiros desmamados por fêmea/ano. Desta forma, obtendo-se maior quantidade de cordeiros nascidos e desmamados por ovelha, durante a sua vida sexual útil, aumentará a possibilidade de reposição de matrizes e reprodutores de qualidade genética superior para reposição do rebanho e maior quantidade de animais destinados à venda. Entretanto, para a obtenção de altas produções com eficiência econômica são necessários investimentos por parte do ovinocultor em animais geneticamente selecionados para a produção de carne, associado ao controle sanitário, alimentação adequada e práticas especializadas de manejo reprodutivo.

Uma das ferramentas naturais para a intensificação dos sistemas com enfoque comercial, solucionando o problema de entressafra na produção e terminação de cordeiros para corte e aumento nas taxas de desfrute anual, é a prática do manejo de dois partos por ano, três partos em dois anos ou partições em blocos.

Em condições de clima tropical, onde não ocorre efeito sazonal na atividade sexual ao longo do ano, o sistema de intensificação reprodutiva pode ser aplicado, principalmente, nas raças ovinas que apresentam satisfatória capacidade leiteira para criar seus cordeiros, boa prolificidade e frequentes partos gemelares. Estes animais em condições favoráveis de disponibilidade alimentar balanceada e perfeito estado de higidez podem se apresentar férteis durante todo o ano. Entretanto, é de suma importância que não ocorra descontinuidade em nenhuma etapa no sistema de criação, como a deficiência crônica na disponibilidade alimentar e controle de doenças inerentes às estações seca e chuvosa, a falta de ajustes no manejo durante os períodos de altas ou baixas temperaturas, pois isso pode interferir de forma extremamente negativa na produtividade dos animais (CUNHA et al., 2004; GONZALEZ, 2006b).

Em regiões de clima temperado onde os ovinos sofrem efeito marcante da sazonalidade sexual, a prática de manejo com três partições a cada dois anos ou em blocos pode necessitar, em uma das estações reprodutivas, o auxílio de sincronização artificial farmacológica do ciclo estral. Neste caso peculiar, a fecundação deverá ser executada por intermédio da inseminação artificial com sêmen congelado-descongelado, por transposição cervical ou com o uso de laparoscópio.

Monta natural controlada

Com o objetivo do conhecimento dos índices reprodutivos dos animais e de manter em ordem a escrituração zootécnica da propriedade, a monta natural deve ser controlada. Para tal finalidade devem ser adotadas as seguintes recomendações: o reprodutor somente será trazido à presença das fêmeas em estro no momento das coberturas; os machos rufiões podem permanecer em tempo integral com o rebanho ou serem introduzidos neste em intervalos de 12 horas para a identificação das ovelhas em estro; deve ser utilizado um colete marcador ou mesmo o peitoral do rufião pintado com uma mistura de óleo vegetal e tinta em pó, para a sinalização por meio da coloração da parte posterior da ovelha que se deixou montar; a mudança da cor da mistura deve ser feita a intervalos de 15 dias, utilizando-se as cores mais claras no início e as mais escuras no final da estação reprodutiva, este cuidado possibilita a identificação das fêmeas que retornaram ao estro e seu novo encaminhamento ao assinalamento pelos rufiões.

Nas fichas sob o controle do operador devem constar as seguintes anotações: número da ovelha; data da cobertura; número do reprodutor utilizado; número de coberturas; e previsão do parto. Por ocasião da partição, registrar o tipo de parto (simples, duplo ou triplo) e peso das crias.

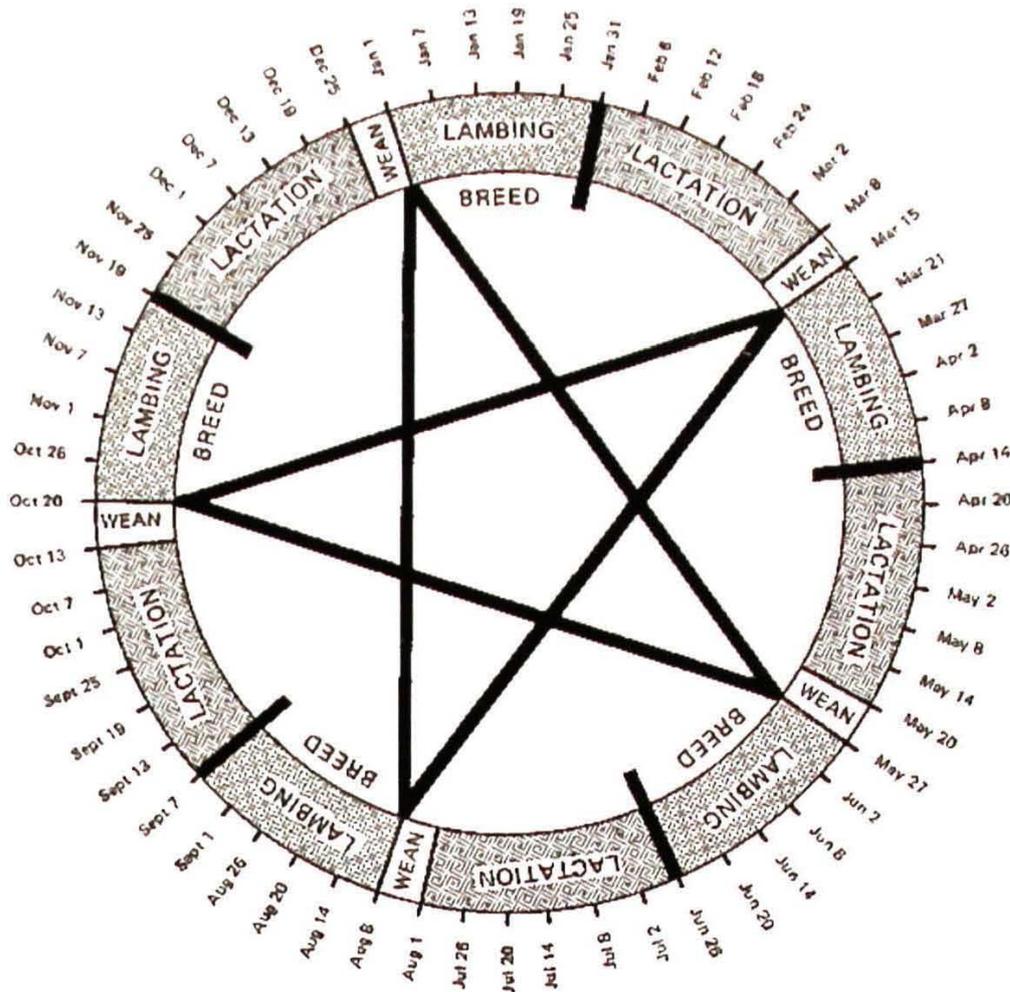
Manejo intensivo na reprodução natural de ovinos

É o sistema onde são programadas partições sequenciais de acordo com a capacidade fisiológica das ovelhas. A intensificação do nascimento de cordeiros ao longo do ano é altamente necessária em regiões onde exista uma demanda comercial de carne ovina e haja comercialização de matrizes e reprodutores selecionados para reposição de rebanhos. O número de partos por ano deve ser esta-

belecido em função do nível tecnológico atingido na propriedade, o tipo de raça ou cruzamento explorado, a localização geográfica, as condições edafoclimáticas da fazenda, o seu potencial de produção de forragem, pasto silagem ou feno, critério de natureza vital para o manejo dos animais nas épocas de escassez de alimentos. Em determinadas criações, este número pode ser de três partos em dois anos. No último caso, os ovinos são acasalados a cada oito meses. Por ser um programa reprodutivo, requer preferencialmente o uso de fêmeas com grau baixo de estacionalidade, trabalho que exige manejo intensivo e não é tecnicamente recomendado para os ovinocultores que não alcançaram produção máxima em programas convencionais.

É inegável que a intensificação da parição é uma ferramenta reprodutiva que incrementa de forma significativa o número de produtos nascidos e criados em um determinado período, apresentando as seguintes vantagens: produção adicional de cordeiros por ovelha antes que esta seja descartada; ovelhas velhas ou secas na primavera podem ser repassadas para a cobertura para parição no outono ou no inverno em seu último ano de produtividade; incrementa a safra de cordeiros selecionados para a reposição do rebanho; aproveitamento de mão de obra e instalações ao longo do ano; e teoricamente incrementa o lucro por fêmea a campo. Entretanto, são acrescidos custos relativos a confecção de rações, conservação de alimentos, aquisição de vacinas e medicamentos necessários para o controle sanitário básico, utilização de fármacos para promover a sincronização e indução do estro e ovulação e adequação física de instalações. Então, a decisão de dispensar um maior investimento para a concretização desta finalidade fica a critério dos objetivos pretendidos pelo criador.

Em um modelo americano de sistema intensivo de produção (Figura 1-2) denominado Star, as ações são desenvolvidas em cinco blocos de atividades durante o ano. E esta é dividida da seguinte forma: estação da reprodução; fase de gestação das fêmeas; época das partições; período dos nascimentos; e lactação das ovelhas e criação dos cordeiros. Todas as fases da produção ovina são feitas em locais separados (que podem ser chamados de retiros) e os animais submetidos a manejos nutricionais e gerais compatíveis com a sua categoria e seu momento fisiológico de produtividade. Neste sistema, todas as etapas da cadeia produtiva são desenvolvidas ao longo do ano, apresentando duas vantagens básicas como a eliminação do



▼ **FIGURA 1-2** - Diagrama do sistema de produção em cinco blocos. Fonte: Mathis e Ross (2000).

problema de entressafra e ocupação máxima da mão de obra disponível na propriedade.

Em muitos casos, o aumento na prolificidade, ou seja, o nascimento de mais de um cordeiro por ovelha – desde que ela tenha capacidade para desmamá-lo –, pode intensificar a produção. Para tanto, é necessário identificar as ovelhas que gerem partos duplos ou triplos e direcionar as cordeiras das mesmas para o rebanho de matrizes, o que deve aumentar a prolificidade do rebanho com o passar tempo.

Implicações de manejo em função do tipo da estação sexual

As estações de acasalamento ou cruzamento e a intensidade de suas execuções estão diretamente relacionadas ao total de cabeças exis-

tentes no rebanho, sendo o objetivo primordial da exploração e a infraestrutura humana e física disponível na propriedade. De qualquer forma, os métodos devem ser simples, rápidos, econômicos e que maximizem o trabalho dos reprodutores e matrizes.

O método mais simples é, com certeza, a monta natural consistido apenas no uso dos reprodutores. No entanto, esta prática de reprodução deve adotar certos critérios de execução para uma melhor eficácia, como, por exemplo: adotar sempre o exame andrológico prévio dos carneiros no período de 30 a 60 dias antes do início das estações de coberturas; as montas devem ser preferencialmente controladas, conforme descrito anteriormente neste capítulo; e manter um trabalho de seleção e escrituração zootécnica permanente na propriedade, com descarte de animais que apresentem defeitos genéticos, fêmeas inférteis e sem habilidade materna, ou machos com libido baixa.

Apesar de ser simples, a execução da monta natural pode não ser a mais econômica. Isso ocorre em virtude do exaustivo trabalho dos reprodutores em rebanhos extensos, o que acarretará dispendiosa mão de obra para controle diário das coberturas e anotações em fichas a campo, manejo intensificado nos cuidados sanitários e nutricionais dos animais.

A inseminação artificial (IA) convencional, com duração de no mínimo seis semanas, exige o trabalho de pessoal especializado para a colheita, avaliação microscópica da qualidade do sêmen e inseminador experiente para a deposição da dose no trato genital da fêmea. A necessidade da adequação de uma sala próxima às baias, simples, mas asséptica, e que possibilite ao técnico executar o correto manuseio dos ejaculados. Esse método não é de simples execução, mas maximiza o uso dos reprodutores. No entanto, deve-se considerar que a IA exige requisitos mínimos de intensificação de manejo reprodutivo e as condições mínimas necessárias devem ser atendidas.

Na sincronização artificial farmacológica do ciclo estral, apesar das despesas com os hormônios usualmente empregados, a inseminação artificial convencional pode ser concentrada em 42 dias, minimizando a mão de obra do pessoal de apoio, evitando o desgaste físico dos reprodutores e reduzindo a sobrecarga no manejo sanitário e nutricional dispensado aos animais. O emprego dessa biotecnologia caracteriza-se pela rapidez e maior aproveitamento dos reprodutores.

Cabe ao criador avaliar qual o melhor método que será adotado, em função, do seu objetivo de exploração ovina e das condições de estruturas físicas, alimentos, pessoal técnico e de apoio disponíveis em sua propriedade.

Medidas importantes com as fêmeas no período pós-reprodução

- Evitar o transporte nos primeiros 30 dias.
- Continuar com as estratégias nutricionais por 15 a 30 dias após os acasalamentos.
- Fornecer suplementação mineral.
- Manter o controle laboratorial da carga parasitária, que serve como critério de descarte para fêmeas que apresentem alto OPG.
- Providenciar sombreamento quando em altas temperaturas.
- Providenciar abrigo quando em baixas temperaturas.
- Disponibilizar água à vontade.
- Evitar o manejo brusco.
- Evitar a aplicação oral ou parenteral de medicamentos desnecessários.
- Manter reprodutores e machos rufiões em rebanho separado
- Diagnosticar as fêmeas vazias e retirar do rebanho.
- Adequar um cercado da propriedade como local de maternidade (pastagem baixa, limpa, sem acesso diretos a corpos de água e perto da sede).

Índices de produtividade do rebanho

2



A eficiência reprodutiva de um rebanho constitui um parâmetro de expressão econômica em sistemas de produção para fins comerciais. Dentre os critérios gerais de avaliação no desempenho reprodutivo dos animais, podemos enumerar: na fêmea, a idade à puberdade e ao primeiro parto, o intervalo entre partos e a quantidade expressa em quilogramas de cordeiro desmamado ao ano; no macho, a idade à puberdade, qualidade de sêmen na fase adulta e capacidade de serviço durante sua vida reprodutiva. Entretanto, a maximização da produção está atrelada ao investimento em melhoramento genético dos animais para a produção de carne, como a adoção de tecnologias para o controle sanitário, alimentação e manejo reprodutivo adequados em cada região do Brasil.

A mensuração dos índices de produtividade de um rebanho são muito importantes para a identificação da relação benefício-custo positiva ou negativa de uma propriedade.

Índice de Fertilidade (IF)

Este índice mede a eficiência reprodutiva dentro de cada estação de cobertura, sendo o somatório do desempenho sexual das fêmeas e do reprodutor, ou seja, o número de fêmeas expostas, cobertas e gestação positiva. Em toda a propriedade o objetivo é obter-se um índice o mais próximo de 100%, percentual praticamente impossível. Entretanto, seguindo-se as técnicas corretas de manejo nutricional e sanitário, os índices de fertilidade podem ser entre 80% a 90%. A equação é a seguinte:

$$\text{IF} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas gestantes}}{\text{n}^\circ \text{ total de fêmeas expostas}} \times 100$$

Índice de Prolificidade (IP)

O índice de prolificidade significa o número de cordeiros nascidos pelo número de ovelhas do rebanho. É de suma importância que o seu valor seja satisfatório em sistemas de criação com propósitos de abastecimento de mercado. A fêmea ovina pode ovular mais de dois óvulos por cio fértil e levar a gestação a termo com dois ou três cordeiros. Entretanto, este favorável desempenho produtivo na ovelha deve impreterivelmente ser associado à boa habilidade materna e

suporte nutricional para a terminação saudável de pelo menos dois produtos. De maneira geral, as fêmeas ovinas apresentam prolificidade média de 1,3, em termos percentuais significa o nascimento de 130 cordeiros de um total de 100 ovelhas paridas. Um índice de prolificidade pode ser utilizado para cada ovelha, objetivando a seleção de ovelhas mais prolíficas.

$$IP = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cordeiros nascidos no rebanho}}{\text{n}^\circ \text{ de ovelhas}}$$

Habilidade Materna (HM)

Uma fêmea considerada portadora de boa habilidade materna deve apresentar as seguintes características: facilidade de parto, capacidade de produção de leite para a amamentação de sua cria e demonstrar carinho e cuidados pelo cordeiro desde o nascimento até a desmama. A habilidade materna está diretamente relacionada com maiores percentuais de mortalidade dos cordeiros. É fundamental o estabelecimento do vínculo mãe-cria, este fato pode não ocorrer devido à rejeição da(s) cria(s) por mães incapazes. A recomendação técnica para uma criação racional e de produtividade é o descarte das fêmeas não portadoras dessa característica.

Eficiência Reprodutiva (ER)

Este indicador de um rebanho é destinado à exploração de corte e significa a relação entre o número de cordeiros desmamados e o número de fêmeas (no rebanho) cobertas durante o ano, assim calculada:

$$ER = \frac{\text{número de cordeiros desmamados/ano}}{\text{número de fêmeas cobertas/ano}}$$

Intervalo entre Partos (IP)

O período médio de gestação na fêmea ovina é 150 dias (142-156). Em regiões tropicais nos sistemas em que os rebanhos são mantidos em condições sanitárias e nutricionais excelentes e que possam ser contornadas as adversidades edafoclimáticas nas épocas de carências típicas de cada região é possível obter-se um parto a cada oito meses, ou 1,5 partos/matriz/ano. Nas regiões de clima temperado

este intervalo entre partos poderá ser obtido com o auxílio de programas de sincronização do ciclo estral. Também, são importantes os fatores alimentação, sanidade e adequação do manejo geral aos animais.

Índice de Mortalidade de Crias (IM)

Os problemas mais importantes relacionados com a mortalidade perinatal de cordeiros são descritos como sendo: a raça, a idade dos animais, o número de cordeiros nascidos, o manejo pré-parto (cas-carreio em landas, nível de estresse), o peso ao nascer, a disponibilidade do colostro nos três primeiros dias de vida, o comportamento da fêmea e o da cria, o desenvolvimento da glândula mamária da ovelha, as condições climáticas e o controle de predadores naturais. A capacidade de sobrevivência dos neonatos é altamente influenciada pela interação comportamental dos animais, sendo fundamental o estabelecimento do vínculo materno-filial, o qual deve ocorrer no próprio local do nascimento. Deve ser respeitado o “período crítico” de união da ovelha ao cordeiro, que é muito curto. Se a cria for removida logo após o nascimento, esta será rejeitada pela mãe quando apresentada a ela no intervalo de 6 a 12 horas mais tarde.

O cálculo final do Índice de Produtividade do Rebanho - IPR é obtido pela fórmula:

$$\text{IPR} = (\text{n}^\circ \text{ de Matrizes} \times \text{IF} \times \text{IP} \times \text{ITP})$$

Em sistemas modelos de criação ovina que adotam medidas racionais de manejo geral e emprego de biotecnologias reprodutivas modernas, compatíveis com o poder aquisitivo e o objetivo comercial do proprietário, é possível termos o seguinte quadro reprodutivo: período de gestação em torno de cinco meses; período de descanso sexual em torno de dois meses (o puerpério se completa entre 35 a 60 dias); intervalo entre partos de oito meses; período de serviço de três meses; idade à primeira cobertura entre sete e oito meses; índice de prolificidade médio entre 1,0 a 1,3; nas raças com aptidão para a produção de carne, a terminação dos cordeiros destinados ao abate pode ser alcançada entre 60 e 90 dias de idade. Os resultados a serem alcançados na taxa de reposição do rebanho e o total de quilos de cordeiros desmamados em cada estação sexual estarão diretamente atrelados ao número de cabeças existente no rebanho.

Princípios da manipulação farmacológica do ciclo estral

3



A manipulação do ciclo estral na fêmea ovina constitui uma biotécnica que possibilita a sincronização de estros, a indução e concentração das ovulações, com a finalidade de estimular a funcionalidade da reprodução.

A estimulação da atividade reprodutiva ou a intensificação do manejo é de grande interesse e indispensável na utilização da inseminação artificial em momento pré-fixado, com ou sem a observação das manifestações de estro ou no preparo de receptoras de embriões frescos ou criopreservados, independentemente da época do ano, o que determina maior ou menor aporte alimentar (MORAES et al., 2002; SOARES; GONZALEZ, 2007).

A taxa de ovulação na ovelha é controlada pelo recrutamento de um número limitado de folículos dependentes da liberação e atuação das gonadotrofinas endógenas, com aumento na sua exigência. Quando a ovulação é induzida em ovelhas em anestro sazonal, somente os folículos antrais que estão presentes no momento da administração do hormônio gonadotrófico exógeno podem responder a este evento. Este fato determina que o tratamento empregado para a indução da ovulação no final da fase lútea seja feito com a administração única de Gonadotrofina Coriônica da Égua Prenhe (Mc NEILLY et al., 1991; SCARAMUZZI et al., 1993; BARIL; SAUMANDE, 2000).

Protocolos longos

Em ovinos alocados em regiões próximas à linha do equador, a resposta frente aos tratamentos hormonais de longa duração – em torno de 11 a 14 dias – com a finalidade de sincronização do estro e indução da ovulação são altamente eficazes. As taxas de manifestações clínicas são da ordem de 55% a 95%, respectivamente, após a associação da utilização de esponjas vaginais impregnadas com 30 mg de FGA (Acetato de Fluorogestona) e a aplicação de 200 e 400UI de eCG (Gonadotrofina Coriônica da Égua Prenhe). Segundo Pinheiro et al (2001), essas taxas ovulatórias podem oscilar entre 63,3% a 79,9 %, com a aplicação deste hormônio.

Resultados altamente satisfatórios foram observados na sincronização do estro e a da taxa de ovulação em 104 ovelhas mestiças da raça Santa Inês, utilizadas como receptoras de embriões ovinos da raça Dorper, congelados pelo método clássico, com aplicação de

tratamento hormonal longo de 14 dias. O protocolo consistiu na colocação de dispositivos vaginais de poliuretano impregnados com 60 mg de MAP (Acetato de Medroxiprogesterona). No final do tratamento progestativo, as fêmeas receberam 400UI de eCG. O estro foi monitorado por machos vasectomizados a partir de 12 até 84 horas após a remoção dos pessários vaginais. No vigésimo primeiro dia do programa, foi realizada a avaliação dos ovários e inovulação dos embriões com o auxílio do laparoscópio. O início da observação dos sintomas de estro foi $57,20 \pm 8,30$ horas, com duração média de $49,45 \pm 15,28$ horas. A taxa ovulatória apresentou-se em torno de 100% (SOARES et al., 2002).

O tempo entre a retirada da esponja e o início do estro é determinado pelo tipo de dispositivo vaginal, além de outros fatores, como a estação do ano, a idade do animal, estado nutricional e o uso de eCG (ROMANO et al., 2001; CORDEIRO et al., 2002).

Em ovinos da raça Santa Inês, classificados como animais de baixo grau de estacionalidade, o uso do *efeito macho* confere importante ferramenta na indução da atividade cíclica. Transcorridos 60 dias de isolamento das ovelhas de reprodutores ou machos rufiões e expostas na presença destes, apresentam no período de cinco dias manifestações de estro e concentração de 2 ng/mL da progesterona plasmática (P4), confirmando a ciclicidade sexual. Entretanto, em ovinos das raças Suffolk e Romney Marsh, respectivamente, considerados de estacionalidade de grau médio e alto, a resposta da ativação reprodutiva somente pelo emprego do *efeito macho* não é eficaz. Nos animais em anestro sazonal e dependendo da localização geográfica, o emprego de progestágenos é o mais utilizado e eficaz na desestacionalização e sincronização do estro, induzindo a um ciclo estral artificial (SASA et al., 2003; DIXON et al., 2006).

No estado da Paraíba, em um total de 374 ovelhas receptoras de embriões, foi aplicado hormônio via intramuscular e colocação intravaginal de dispositivos impregnados com progesterona natural e sintética, com a finalidade de sincronização de estro e indução da ovulação para formação de um corpo lúteo funcional para manutenção da gestação do embrião(ões) inovulado(s). O protocolo utilizado foi de 14 dias, sendo que 237 animais receberam dispositivos vaginais (CIDR) impregnados com 0,33 mg de progesterona natural e 137 receberam esponjas vaginais de poliuretano impregnadas com 60 mg de progesterona sintética. A resposta ovulatória apresentou-se em torno de 100% (SOARES et al., 2003).

Somente o emprego do tratamento com progesterona sintética por meio da colocação vaginal de esponjas impregnadas com 50 mg de MAP, durante 12 dias, promoveu a indução de estro em percentuais de 95,6%, após 48 horas do final deste, em raças ovinas classificadas como grau médio de sazonalidade reprodutiva. Os índices de gestações obtidos por monta natural foram de 95,65% (ROCHA et al., 2010).

Protocolos curtos

O emprego de protocolos de curta duração em ovinos, em torno de cinco a seis dias para a sincronização do estro, visa reduzir a frequência da dispersão na ocorrência dos estros, a exemplo do utilizado na espécie caprina (LOPES JÚNIOR et al., 2001).

Em ovelhas da raça Suffolk, consideradas de média estacionalidade sexual, pode ser recomendado o uso de protocolo curto de seis dias, composto da associação de progestágenos, prostaglandina e eCG, aplicados da seguinte forma: no **D0** (dia zero) colocação das esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de MAP; no **D4** (dia quatro) administração de 100 µg de cloprostenol e 350 a 400UI de eCG; no **D6** (dia seis) remoção das esponjas. A manifestação do estro ocorre no percentual de 100%, no período entre 55 e 72 horas do final do tratamento progestativo (BICUDO ; SOUSA, 2003).

Na ovelha Santa Inês também são relatados resultados satisfatórios com a utilização de tratamentos hormonais de curta duração. No período de 58 dias após o parto, 13 ovelhas foram submetidas à sincronização do estro por meio da colocação de esponjas vaginais por cinco dias. A detecção do estro iniciou 12 horas após a retirada destas e foi monitorada a cada quatro horas, executando-se em seguida a monta natural. O total de 88% (11/13) das fêmeas manifestou estro clínico e a taxa de fertilidade foi de 62% (LIMA et al., 2005).

Na região Centro-Oeste, em ovelhas da raça Santa Inês um protocolo curto, empregando-se dispositivo intravaginal Eazi-Breed CIDR® (Pfizer) impregnado com 0,33 g de progesterona natural, que permaneceu inserido por nove dias (D0 a D9). No sétimo dia (D7) as ovelhas receberam 200UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex S.A.). Este procedimento usado para a indução da ovulação possibilitou uma taxa de gestação de 57,1%, confirmada por ultrassonografia, aos 45 dias após a inseminação intrauterina (GILBERTI, 2007).

Em condições de clima temperado, como no estado de Santa Catarina, o uso de protocolos hormonais curtos com duração de seis dias para induzir a ocorrência de um ciclo estral artificial em ovinos da raça Texel apresentou resultados de 65% a 70% na frequência do estro clínico, seguidas 36 horas do término do tratamento com progesterona sintética. Os protocolos hormonais consistiram na colocação vaginal de esponjas impregnadas com 50 mg de MAP, e no momento da colocação deste dispositivo uma aplicação de 25 µg de prostaglandina sintética por via sub-mucosa vulvar ou duas aplicações deste agente luteolítico na colocação e na retirada dos pessários vaginais. Nos dois métodos, os resultados de gestação das ovelhas, confirmados por ultrassonografia, apresentaram-se em torno de 90% (ROCHA et al., 2010).

A Tabela 3-1 apresenta resultados de frequência do estro em função da duração do protocolo hormonal utilizado.

A seguir, a Tabela 3-2 apresenta resultados da sincronização do estro em ovinos em função da raça, duração do tratamento e dose dos hormônios e agentes luteolíticos.

TABELA 3-1. Frequência acumulada (%) e proporção de ovelhas Suffolk em estro após retirada da esponja vaginal em dois tipos de protocolos

PROTOCOLO	TEMPO DO ESTRO APÓS A RETIRADA DA ESPONJA (HORAS)		
	< 30	30 A 54	55 A 72
Curta duração (5 a 6 dias)	16,7% 10/60	85,0% 51/60	100,0% 60/60
Longa duração (10 a 14 dias)	8,5% 17/200	88,5% 174/200	87,0% 177/200

Fonte: Bicudo e Sousa (2003).

TABELA 3-2. Sincronização de estro em ovinos em função da raça, duração do tratamento e dose dos hormônios e agentes luteolíticos

RAÇA /NÚMERO	DISPOSITIVO VAGINAL	DURAÇÃO/ PROTOCOLO (DIAS)	HORMÔNIO/DOSE OVULAÇÃO (OV)	ESTRO CLÍNICO (%)	FONTE
Deslanada/25	Esponja/30 mg FGA	Longo/12	200UI eCG	55,0	Dias et al. (1999)
Suffolk/44	Esponja/50 mg MAP	Longo/4	500UI eCG	Sem controle	Milczewski et al. (2000)
S. Inês/25	Esponja/50 mg MAP	Longo/14	200UI eCG	Sem controle	Pinheiro et al. (2001)
S. Inês/28	Esponja/30 mg FGA	Longo/12	G1=26 Sem eCG	34,6 OV = 23,1	Dias et al. (2001)
S. Inês/29	Esponja/30 mg FGA	Longo/12	G2=30 200UI eCG	76,7 OV = 73,3	Dias et al. (2001)
S. Inês/29	Esponja/30 mg FGA	Longo/12	G3=30 400UI eCG	96,7 OV = 63,3	Dias et al. (2001)
S. Inês/104	Esponja /60 mg MAP	Longo/14	400UI eCG	100,0 OV = 1,6 ± 0,60	Soares et al (2002)
S. Inês/237	Dispositivo/CIDR 0,33 mg progesterona natural	Longo/14	400UI eCG	100,0	Soares et al (2003)
S. Inês/137	Esponja/60 mg MAP	Longo/14	400UI eCG	100,0	Soares et al (2003)
S. Inês/33	Dispositivo /CIDR 0,33 mg progesterona natural	Longo/14	400UI eCG	100,0	Gonzalez et al. (2006a)
Texel/23	Esponja/60 mg MAP	Longo/12	Sem	95,6	Rocha et al. (2010)
Suffolk/60	D0 = Esponja/60 mg MAP D4 = 100 µg Cloprostenol	Curto/6	350-400UI eCG	100,0	Bicudo e Sousa (2003)
S. Inês/13	Esponja/60 mg MAP + 50 µg Cloprostenol	Curto/5	300UI eCG	88,0	Lima et al. (2005)
S. Inês/84	Dispositivo/CIDR 0,33 mg progesterona natural	Curto/9	200UI eCG	Sem controle	Gilberti (2007)
Texel/20	Esponja/60 mg MAP + 50µg Cloprostenol	Curto/6	25 µg Análogo de Prostagandina Uma aplicação	95,0	Rocha et al. (2010)
Texel/20	Esponja/60 mg MAP + 50 µg Cloprostenol	Curto/6	25 µg Análogo de Prostagandina Duas aplicações	90,0	Rocha et al. (2010)

FGA – Acetato de Fluorogestona; MAP – Acetato de Medroxiprogesterona; eCG – Gonadotrofina Coriônica da Égua Prenhe; CIDR – Dispositivo vaginal em forma de Y impregnado com progesterona natural.

Bioestimulação sexual pelo *efeito macho*

4



A utilização de métodos naturais de estimulação sexual em ovinos representa importância prioritária nos diversos programas de reprodução assistida, visando minimizar o uso ou a concentração de hormônios, preservando, desta forma, a saúde e a maior vida útil produtiva e reprodutiva das fêmeas. Atualmente, a bioestimulação da reprodução está conquistando um espaço novo em rebanhos alocados nos distintos ambientes naturais do planeta, como tratamento isolado ou auxiliar aos farmacológicos.

A introdução de carneiros em um rebanho de fêmeas anovulatórias (Figura 4-1) promove a indução da ovulação no tempo de dois a quatro minutos, um aumento na frequência da pulsação de LH, e esta pode ocorrer em torno de 36 horas depois em descarga ovulatória, acarretando uma primeira ovulação, dois a quatro dias após o início do contacto com os mesmos. Esta primeira ovulação é denominada de silenciosa, porque não é associada a comportamento de estro clínico. Este é manifestado em alguns animais, associado à segunda ovulação, 17 a 20 dias após a introdução dos carneiros (MARTIN et al., 1986).

Em algumas ovelhas, a primeira fase lútea tem duração curta, em torno de cinco a seis dias, com a ocorrência de nova ovulação, também não acompanhada por estro, mas seguida de uma fase lútea normal. Nestes animais, apenas a terceira ovulação é acompanhada de estro em torno de 24 dias, após a introdução dos machos. A taxa de ovelhas que ovulam é baixa caso os carneiros sejam retirados entre 8 a 24 horas de sua introdução no rebanho, sugerindo ser indispensável a permanência destes mais tempo para a indução da ovulação (ROSA; BRYANT, 2002).

A atribuição positiva à presença do macho ou rufião é a redução do tempo entre a retirada da esponja vaginal, o início do estro e a ovulação, ocorrendo picos de LH entre 24 e 48 horas após a remoção desta, concentrando a frequência dos estros. Dessa forma, as ovelhas apresentam-se no melhor estágio clínico deste evento fisiológico para a inseminação artificial após 42 a 52 horas do término do tratamento progestativo e a variação entre as ovelhas do período compreendido entre a remoção da esponja e a ovulação é reduzida (ROMANO et al., 2000; 2001).

A ocorrência de regressão prematura de corpos lúteos, evento responsável por acarretar ciclos curtos, ainda não tem a sua causa completamente elucidada. Entretanto, muitos experimentos demonstram a participação do útero na regressão do corpo lúteo,

sugerindo que a curta duração destas estruturas é resultado da síntese prematura de PGF_2 por este órgão. É um fato que o tratamento prévio de ovelhas com progesterona submetidas ao *efeito macho* inibe a ocorrência de fases lúteas curtas, evidenciando que a falta deste hormônio circulante e sua ação inibidora na secreção de estradiol permitem a síntese de receptores endometriais para a ocitocina cinco dias após a introdução dos machos, acarretando a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e lise prematura do corpo lúteo. Fêmeas que recebem dispositivos vaginais impregnados com progestágenos por um período mínimo de 10 dias e no final são submetidas ao *efeito macho* apresentam estro ovulatório (LASSOUED et al., 1997).

A ocorrência do *efeito macho* parece depender principalmente de sinais olfatórios oriundos dos feromônios produzidos pelos machos por estímulo dos andrógenos e estímulos comportamentais, exteriorizados na fase de cortejamento. Os feromônios produzidos pela pele, principalmente na região ao redor dos olhos, atuam primariamente através do sistema olfatório. Outro fator que parece interferir na resposta da fêmea é a sua experiência sexual. Em ovelhas que nunca tiveram contato com carneiros, o odor natural destes pode não ativar a secreção de LH (GELEZ; FABRENYS, 2004; ROSA; BRYANT, 2002).

A resposta da fêmea à presença do macho depende da intensidade do estímulo e da receptividade da mesma, isto é, do tempo do anestro estacional. Ovelhas de raças com um forte padrão sazonal não responderão por mais forte que seja o estímulo. Contudo, em fêmeas de raças classificadas com grau baixo de sazonalidade, que estejam no final do período de anestro e próximas do período normal da estação reprodutiva, será suficiente um estímulo pequeno (UNGERFELD, 2004).

A percentagem de fêmeas em anestro que ovula após a introdução de machos aumenta quando em simultâneo são introduzidas fêmeas em estro, as quais promovem o *efeito fêmea* (KNIGHT, 1985). Estas induzem nos reprodutores a secreção de pulsos de LH e o aumento dos níveis de testosterona no período de 4 a 8 horas de contato. As concentrações deste hormônio permanecem elevadas por vários dias, estimulando a secreção dos feromônios. O comportamento dos carneiros em relação às ovelhas em estro fornece estímulos visuais adicionais para as ovelhas anovulatórias. A presença de fêmeas em estro com carneiros que tenham acasalado recentemente possibilitará que as ovelhas anovulatórias sejam expostas a estímulos olfa-

tivos, tácteis e visuais, que podem potencializar a eficácia do *efeito macho* (CHEMINEAU; COGNIÉ, 1984).

Estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de otimizar o *efeito macho* e os tratamentos hormonais para estimular ou sincronizar uma resposta na fertilidade das ovelhas. Os primeiros fatores a serem monitorados são a condição corporal e o tempo de anestro sazonal das fêmeas, os quais influenciam diretamente na resposta satisfatória destas a esse efeito. Ovelhas submetidas à sincronização de estro pela aplicação de progestágenos por meio de esponjas vaginais e expostas aos machos nos últimos três dias de tratamento apresentam um rápido aumento da secreção de LH, antecipação do início e do fim do estro, do pico de LH e da ovulação. Entretanto, a administração de 500UI de eCG no momento da retirada dos dispositivos pode acarretar redução na taxa de parição e da prolificidade (EVANS et al. 2004; HAWKEN et al. 2005).

O *efeito macho* exerce estímulos positivos sobre a indução da ciclicidade de ovelhas que se encontram em anestro sazonal. Contudo, quando estamos em presença de anestros mais intensos testemunhados por uma percentagem de ovelhas em anestro superior a 50% dos animais, a frequência de estro induzido pelo *efeito macho* não corresponde significativamente ao aumento da ovulação estimulada por tratamentos hormonais anteriores. O estímulo do reprodutor acionando a secreção das fracas reservas de gonadotrofinas pela hipófise nestas condições parece piorar a recuperação destas fêmeas, traduzindo-se em ovulações menos competentes nas sincronizações hormonais subsequentes (HORTA; CAVACO GONÇALVES, 2006; VASQUES et al. 2006).

Inseminação artificial (IA)

5



Introdução

A inseminação artificial (IA) na espécie ovina apresenta-se hoje como uma ferramenta perfeitamente exequível e possibilita maior amplitude da fertilidade nos programas de melhoramento animal. A seleção cuidadosa dos atributos genéticos dos ovinos é o fundamento essencial para a potencialização desta biotecnologia como alavanca na propagação acelerada de indivíduos superiores. Uma característica altamente favorável a esta espécie é a sua precocidade, fato do ciclo estral ser de aproximadamente 16 a 17 dias e proporcionar a duração da estação sexual de 60 dias, com a possibilidade de quatro chances de fecundação da fêmea (BICUDO, 2002).

É altamente permissível associar o início do trabalho de IA ao programa de reprodução natural, por meio da sincronização do estro e repasse das ovelhas vazias com a monta natural. A adoção e viabilização da prática de IA exigem um módulo mínimo do rebanho para que haja retorno econômico adequado. Em todos os casos, deve-se questionar se a monta natural não é a opção que melhor atende aos interesses econômicos e do programa de melhoramento genético a ser implementado (BICUDO, 2005).

Implicações na escolha do tipo de processamento do sêmen

Sêmen fresco diluído

A utilização de sêmen fresco diluído implica na intensificação do trabalho e necessidade de mão de obra permanente e capacitada na propriedade para a condução dos seguintes trabalhos: emprego do *efeito macho* no rebanho para a detecção do estro das fêmeas; colheita, avaliação microscópica do ejaculado, principalmente nos critérios motilidade progressiva individual (%) e vigor (escala de 0 a 5); manipulação do sêmen para a sua diluição; preparo da amostra de sêmen; o ato de contenção individual dos animais; e deposição da dose inseminante no sistema genital das ovelhas no dia de serviço.

Outro ponto a ser considerado é a necessidade da disponibilidade de reprodutores na fazenda. O ejaculado de um carneiro com satisfatória condição de higidez apresenta volume entre um a dois

mL, concentração espermática entre dois a seis bilhões e motilidade progressiva retilínea em torno de 80%. Desta forma, a diluição do ejaculado pode ser na proporção de **1:10**, com aproveitamento para até 20 fêmeas com volume da dose inseminante de 0,5 mL.

Sêmen resfriado

O processo de resfriamento do sêmen possibilita a manutenção da viabilidade espermática em torno de 24 a 30 horas. Em detrimento dos critérios utilizados neste, o meio diluidor e a qualidade inicial da motilidade progressiva do espermatozoide deve ser entre 80% e 90% e com vigor de no mínimo 3.

Esta modalidade de processamento dos ejaculados apresenta alguns pontos positivos em relação ao uso do sêmen fresco diluído: minimiza o trabalho necessário para o emprego da IA em rebanhos numerosos; permite que o processamento do sêmen seja executado em local fora da propriedade; não necessita a permanência de reprodutores na fazenda, desta forma, podendo ser desenvolvido uma maior pressão de seleção no rebanho, uma vez que podem ser utilizados os ejaculados de carneiros zootecnicamente superiores de propriedades vizinhas; e possibilita o transporte das doses envasadas em palhetas, desde que em containers isotérmicos apropriados para esta finalidade. A maior exigência é que a técnica somente pode ser executada por médico-veterinário capacitado.

A proporção de diluição recomendada é de **1:2 (v:v)**, conferindo boa densidade final à mistura. A concentração por dose deve ser entre 150 a 200 milhões de espermatozoides viáveis. Um meio diluidor para o resfriamento de sêmen ovino de fácil preparação, aquisição de ingredientes e resultados satisfatórios na manutenção da viabilidade espermática durante 24 a 30 horas apresenta a seguinte formulação: água bidestilada 100,0 mL; leite em pó desnatado (Molico®) 10,0 g; frutose 1,0 g; gema de ovo 10,0 mL. Outro meio recomendado é à base de Holding: meio holding 50,0 mL; frutose 1,0 g; gema de ovo 20,0 mL.

Seguidas as etapas, de colheita do sêmen, avaliação microscópica da motilidade progressiva individual (%) dos espermatozoides e diluição, inicia-se o procedimento de resfriamento. Vale lembrar que a avaliação das características morfológicas das células espermáticas deve ser de conhecimento prévio do profissional. As amostras de sêmen diluído serão envasadas em palhetas de 0,5 mL, lacradas com

alicate selador, colocadas dentro de invólucros plásticos (30x20x20 cm) insuflados com ar e mantidas em geladeira previamente equilibrada à temperatura de 5°C durante 90 minutos (tempo total de equilíbrio), em posição horizontal sobre grades metálicas. Durante os primeiros 60 minutos de resfriamento, os invólucros plásticos permanecerão fechados, sendo abertos nos 30 minutos finais. No final deste procedimento, as palhetas resfriadas são acondicionadas nas caixas isotérmicas equilibradas na temperatura de 5°C e deslocadas até o local das inseminações. Este trabalho exige uma programação sincrônica entre a organização da estação sexual das ovelhas na propriedade pelo pessoal de apoio e a manipulação e processamento do sêmen pelo técnico no laboratório.

Sêmen congelado

A inseminação artificial com esta modalidade de beneficiamento do sêmen maximiza a pressão de seleção zootécnica dentro de um rebanho com avançada condição biotecnológica inserido em programas de melhoramento genético. Isso acontece desde que existam estruturas física compatível e de profissionais treinados para a execução das exigências técnicas impostas pela sua implantação.

As etapas para o desenvolvimento de todo o procedimento criobiológico do sêmen ovino estão discutidas em detalhes no Capítulo 7.

Modalidades de inseminação artificial

A eleição da modalidade de inseminação artificial a ser adotada em um determinado rebanho depende fundamentalmente da possibilidade de seu ajuste ao mesmo nível biotecnológico e necessidade da disponibilidade infraestrutural de cada uma. As técnicas mais usuais na fêmea ovina consistem, basicamente, na deposição do sêmen na abertura cervical, transposição cervical, com possibilidade de maior ou menor grau de penetração ou com tracionamento da cérvix em inseminações profundas.

Inseminação cervical

Esta técnica é de simples execução e ainda muito aplicada a campo em rebanhos numerosos, onde tenha disponibilidade de reprodutores e mão de obra na propriedade.

Nessa modalidade recomenda-se o uso de sêmen fresco diluído. A fêmea pode ser contida em um cavalete pivotante confeccionado com a metade de tambor plástico com capacidade para 200 litros acoplado a uma estrutura de ferro com altura de 1,60 metro do chão. Os animais são mantidos na posição de decúbito ventral sobre a metade do tambor (método conhecido sobre a barra) e em inclinação de 45°. No momento da inseminação são necessários dois auxiliares para a contenção dos membros anteriores e posteriores, proporcionando melhor comodidade do animal e dos operadores, que devem atuar em menor número possível, com o objetivo da exclusão do efeito habilidade.

Após o posicionamento correto da fêmea e sua identificação, introduz-se o espelho vaginal modelo bico de pato, com fonte luminosa, visualiza-se a entrada do canal cervical e, com o auxílio da pipeta de inseminação acoplada de um mandril, a dose de sêmen em torno de 100 a 150 µL é inoculada. A colonização e longevidade da célula espermática do carneiro no genital da ovelha são atributos eficientes para permitirem a flexibilização do momento da inseminação, possibilitando a sua realização pela manhã em sequência da rufiação noturna (GILLAN, et al. 2004).

Inseminação por transposição cervical

A cérvix da fêmea ovina constitui-se em um tubo fibroso, onde o lúmen é obstruído por proeminências e depressões na membrana mucosa formando dobras ou pregas em número de três a sete. A presença dessas inúmeras dobras na cérvix e os anéis excêntricos entre elas são as causas principais da dificuldade de passagem pelo canal cervical durante a IA (KERSHAW et al., 2005; NAQVI et al., 2005). Desta forma, a inseminação artificial por transposição cervical pode ser executada pelo tracionamento do canal cervical.

As etapas do procedimento completo são as seguintes:

1. Conter a fêmea em tronco próprio;
2. Realizar a assepsia da região perianal e vulvar com água e detergente neutro e depois a área enxugada com toalha de papel descartável;
3. Introduzir na vagina de espêculo modelo bico de pato com fonte luminosa para a visualização da entrada do canal cervical;
4. Tracionar a cérvix até o mais próximo possível da entrada do vestibulo vaginal por meio da apreensão das bordas em dois

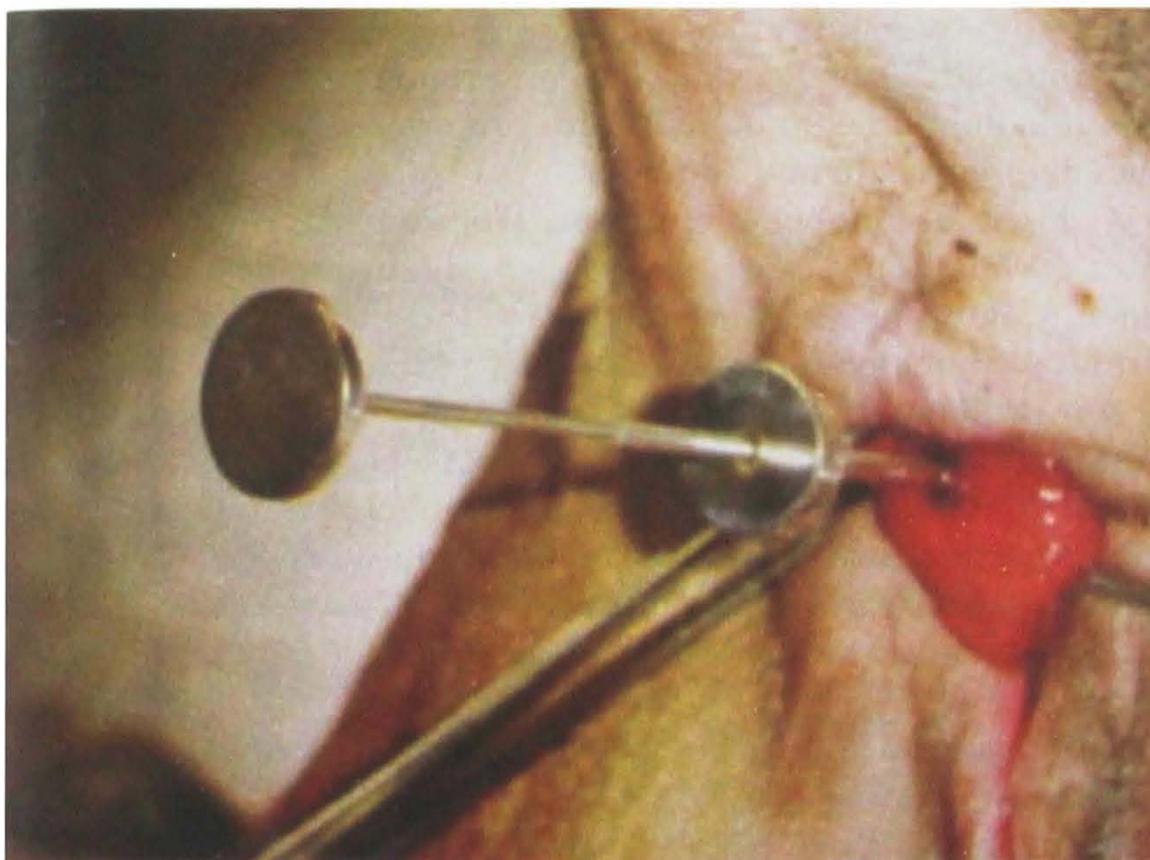


FIGURA 5-1. Momento da inseminação artificial por transposição cervical.

Fonte: Gonzalez et al. (2006).

pontos laterais, com o objetivo de desfazer os anéis e possibilitar o acesso ao canal, que durante todo o procedimento permanece nesta posição com o auxílio de um assistente;

5. O tracionamento da cérvix pode ser com o auxílio de duas pinças Modelo Allis (comprimento entre 20 a 25 cm);
6. Seguida a distensão do canal cervical, introduzir a pipeta de inseminação até o ponto de sua perfeita penetração, sem causar lesão ou sangramento neste, e depositar a dose de sêmen (Figura 5-1).

Inseminação intrauterina por laparoscopia (IAL)

A inseminação intrauterina com o auxílio do laparoscópio possibilita o uso de sêmen congelado com sucesso nos resultados de gestação. A modalidade da IAL permite imprimir ao máximo o melhoramento genético do rebanho porque conta com a criopreservação das doses inseminantes, que podem originar-se de carneiros de alta seleção genética existentes em qualquer parte do planeta.

Entretanto, o emprego da IAL está diretamente ligado à aplicação de protocolos hormonais nas fêmeas, proporcionando um perfeito controle do momento da ovulação, conforme discutido com detalhes anteriormente no Capítulo 3.

As inseminações por laparoscopia são realizadas no intervalo de 55 a 60 horas após a retirada dos dispositivos vaginais e aplicação do eCG, de maneira a constituir-se em um sistema de inseminação artificial em tempo pré-estabelecido (IATF).

O instrumental para a prática da inseminação por laparoscopia consiste das seguintes partes: um laparoscópio rígido de 7 mm de diâmetro; uma fonte de luz com cabo de fibra óptica; duas cânulas com trocarter, uma de 7 mm para a introdução da fonte luminosa conectada ao laparoscópio e insuflação de CO₂ na cavidade abdominal e a outra de 5 mm para a deposição do sêmen dentro dos cornos uterinos.

As etapas para a inseminação por laparoscopia são as seguintes:

1. Submeter as ovelhas ao jejum hídrico por um período de 12 horas que antecede às inseminações e realizar a tricotomia e assepsia com água e detergente neutro da região paramamária;
2. No dia das inseminações, sedar as fêmeas com cloridrato de xilazina na dosagem de 1,1 mg/kg de peso vivo, contê-las e realizar a desinfecção da região tricotomizada com solução de iodo a 10%;
3. A contenção das fêmeas é feita em cama própria reclinável, na posição de decúbito dorsal e inclinação de 45°, sendo assim mantidas durante todo o procedimento;
4. Fazer a primeira punção com o trocarter de 7 mm, 2-3 cm à frente do úbere e à direita da linha alba, introduzir o insuflador e preencher a cavidade abdominal com CO₂, possibilitando uma melhor visualização e manipulação dos cornos uterinos;
5. Fazer a segunda punção com o trocarter de 5 mm, 2-3 cm à frente do úbere e à esquerda da linha alba, e introduzir o instrumental fixador, que tem a finalidade de manipulação do útero para rápida localização e fixação (Figura 5-2);
6. Realizar a descongelação individualmente das palhetas (0,50 mL) com o sêmen congelado, conforme cada ovelha estiver sedada e contida, dividir seu conteúdo (0,25 mL) e inocular na altura da curvatura maior de cada corno uterino com pipetas do tipo ASPIC® (IMV- Ref. 005546);

7. Retirar as cânulas ao fim da manipulação, realizar um ponto simples de sutura com fio categut e agulha curva traumática e desinfectar as feridas.

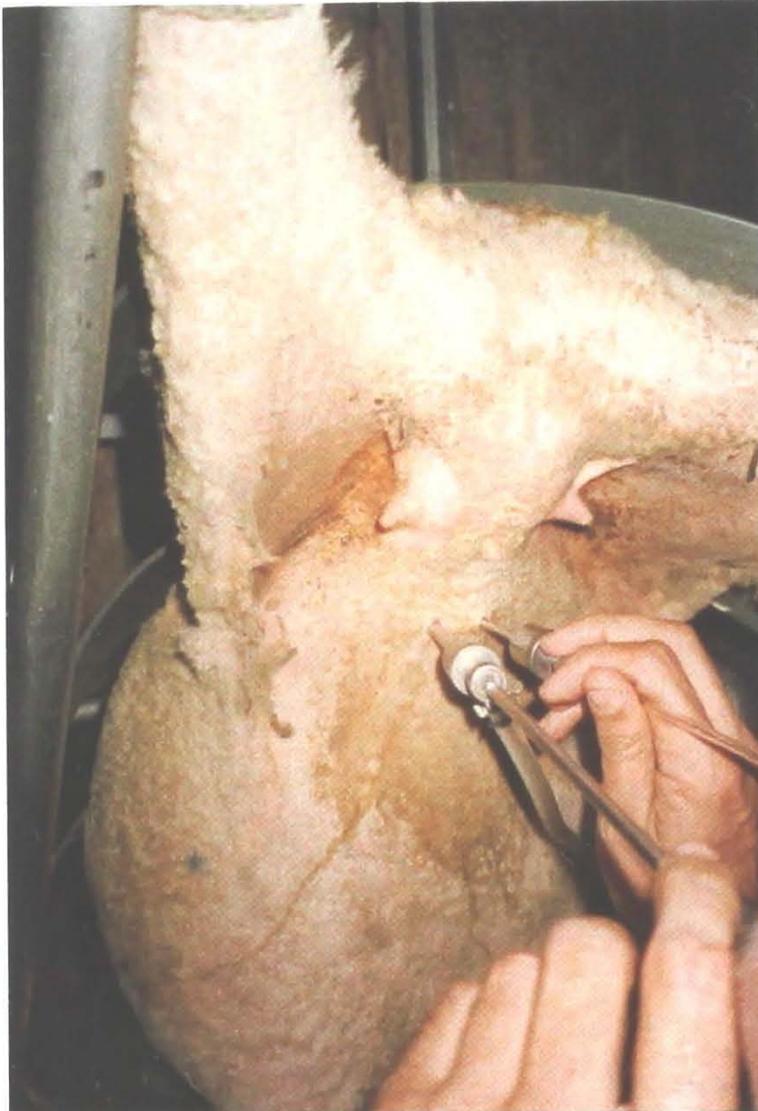


FIGURA 5-2. Locais laterais à linha alba para a introdução dos trocâteres.

Fonte: Gonzalez (2009).

Transferência de embriões (TE)

6



Critérios para execução da TE

Na organização de programas de TE devemos seguir alguns critérios gerais para a obtenção do sucesso desta ferramenta biorreprodutiva. Um desses critérios refere-se a existência de recursos humanos capacitados, que trabalham na equipe técnica e de apoio.

As ovelhas destinadas a doadoras de embriões devem ser portadores de excelentes condições fenotípicas e genéticas, qualidades, estas, obtidas por seleção zootécnica criteriosa e avaliação genômica/proteômica e fêmeas receptoras que preenchem todos os requisitos de seleção, conforme será descrito posteriormente. Estes animais devem ser submetidos ao manejo geral específico, como alimentação melhorada, identificação segura, adoção de medidas sanitárias tais como controle de endoparasitas, aplicação de vacinas contra a ocorrência de clostridioses, leptospirose e controle da atividade sexual.

Outro ponto importante é a disponibilidade de infraestrutura física básica na propriedade. Os equipamentos necessários podem ser simples, mas devem apresentar boas condições de uso, garantindo desta forma a correta colheita, manipulação e criopreservação dos embriões. Os materiais de consumo, como as soluções para a lavagem, manutenção e congelamento dos embriões, hormônios para a superovulação e outros materiais diversos, devem ser escolhidos pela qualidade e eficácia.

No caso em que a fecundação das doadoras seja pela monta natural controlada, a escolha dos reprodutores deve ter como base os seus atributos de seleção zootécnica, conforme o seu padrão racial e avaliação genômica/proteômica e a constatação da libido ativa e qualidade comprovada do sêmen por realização de exame clínico-andrológico.

Se a fecundação for pela inseminação artificial por laparoscopia, as doses de sêmen devem ser adquiridas de centrais cadastradas pelo ministério da agricultura e oriundas de reprodutores de genética comprovada.

Princípios fisiológicos e implicações da superestimulação ovariana

A ocorrência eficaz de ovulações múltiplas em ovelhas constitui uma das etapas críticas em um programa de transferência de em-

bríões (TE), para que este seja economicamente viável e maximize a vida reprodutiva de fêmeas com linhagens genéticas superiores. A diversidade na variabilidade da resposta ovariana frente ao recrutamento, crescimento e maturação folicular até a fase de oócito, mediante ação de gonadotrofinas exógenas, está relacionada com as diversas raças de ovinos, os protocolos para o tratamento superovulatório, a época do ano e a condição nutricional e sanitária da fêmea (STEYN, 2000; SILVEIRA; KOZICKI, 2001).

Em um ciclo estral fisiológico um “pool” de folículos é recrutado e estes iniciam o seu desenvolvimento até que o maior bloqueia o final do desenvolvimento dos outros menores. Existe forte evidência experimental de que este mecanismo denominado dominância ocorre durante a primeira e a última onda folicular ovulatória (BAIRD; MCNEILLY, 1981). Entretanto, existem muitas divergências sobre a possibilidade de dominância nas ondas intermediárias do ciclo estral das ovelhas (RUBIANES, 2000).

Um folículo do “pool” recrutado é selecionado. Este continuará crescendo e amadurecendo até a fase de ovulação, enquanto os outros sofrem atresia. O folículo dominante é dependente em sua fase final de crescimento de pulsatilidade de LH, sendo o folículo maior de uma onda o ovulatório, logo que se estabeleça uma cascata endócrina com o pico pré-ovulatório de LH. Na falta deste, o folículo dominante sofrerá atresia enquanto outra onda folicular se inicia. O mecanismo pelo qual o folículo dominante exerce sua dominância é suprimindo a síntese e liberação de FSH pela hipófise, principalmente pelo *feedback* negativo ocasionado pela sua alta secreção de estrógenos e inibina. Então, o princípio básico da superestimulação ovariana consiste em possibilitar o desenvolvimento até o evento da ovulação de todos os folículos recrutados pela ação do FSH exógeno administrado nos protocolos hormonais (HAFEZ, E.; HAFEZ, B., 2004).

Existem basicamente duas implicações negativas na resposta superovulatória (Figura 6-1) em detrimento da aplicação exógena do FSH. A primeira é referente à ação limitante deste hormônio sobre os folículos que passaram da fase de primordiais e iniciaram o seu crescimento (os recrutáveis). Estes são folículos antrais com diâmetro superior a 2 mm. Em função deste fato, a primeira causa para a ocorrência de respostas não satisfatórias na estimulação ovariana pode ser em função do número reduzido destes folículos recrutáveis presentes nos ovários no início do tratamento hormonal. Outro

ponto é que, por ocasião do primeiro pico pré-ovulatório de LH ser induzido, os grandes folículos podem não apresentar-se maduros o suficiente para desenvolverem-se em corpo lúteo normal. A segunda implicação é citada como a atuação estimulante do FSH sobre os folículos em crescimento normal e os em regressão. Dessa maneira, pela ação positiva do FSH exógeno, o folículo que estava em processo de regressão pode reiniciar o seu crescimento e chegar à ovulação. Entretanto, o ovócito formado está marcado para morrer (BALDASSARRE, 2004). Este processo é denominado apoptose, que significa uma forma programada de morte celular com perda irreversível da estrutura e funções vitais das células. Como resultado, este ovócito não será fertilizado ou sofrerá uma degeneração prematura (KERR et al, 1972).

A origem e o grau de contaminação do LH (hormônio luteinizante) na solução, a partida, a dose, raça, idade, variação individual, condição sanitária, influência de fatores climáticos, são citados como responsáveis pela eficácia da ocorrência de ovulações múltiplas (GUSMÃO ; MOURA, 2005).



FIGURA 6-1. Fêmea ovina superovulada com hormônio folículo estimulante exógeno. Fonte: Gonzalez et al. (2002).

O grau de contaminação do LH na solução do hormônio folículo estimulante (FSH) pode desencadear uma resposta ovariana indesejada, como a funcionalidade prematura de oócitos. Estes poderiam, em parte, ser mantidos como folículos luteinizados, mas seriam considerados de qualidade inferior por serem embriões velhos por ocasião da colheita. A contaminação do LH de até 40,0% na solução do FSH não interfere na taxa de ovulação e no número de embriões recuperados (MOOR et al., 1984; NOWSHARI; HOLTZ; 1995).

O baixo índice de recuperação embrionária ainda obtido em ovinos pode ser atribuído a causas diversas como: os oócitos podem não ser capturados pelas fímbrias em razão do ovário estar muito aumentado de tamanho em virtude da superovulação; transporte acelerado através do trato reprodutivo; formação de corpo lúteo sem ovulação resultante de níveis alterados de esteroides; alterações na composição do oviduto e/ou na secreção uterina podem modificar os padrões hormonais; pode haver rápida desintegração de óvulos não fecundados, no período entre a ovulação e a colheita dos embriões (WILMUT et al., 1985; McNEILLY et al., 1991; PENDLENTON et al., 1992; SAMARTZI et al., 1995).

Base farmacológica para a múltipla estimulação ovariana

O procedimento hormonal inicial para promover a múltipla estimulação ovariana fundamenta-se na sincronização do estro das ovelhas selecionadas como doadoras de embrião. Este pode ser obtido basicamente pela aplicação de três tipos de dispositivos impregnados com progesterona natural ou sintética: dispositivo vaginal de silicone (Controlled Intravaginal Drug Release) impregnado com 0,33 mg de progesterona natural; dispositivo vaginal de poliuretano impregnado com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona; e implante auricular impregnado com progesterona sintética.

A próxima etapa é a administração de análogos da prostaglandina F_2 no sétimo dia do programa (D7) com o objetivo de induzir a luteólise de possíveis corpos lúteos funcionais do ciclo fisiológico anterior. A etapa final para promover o recrutamento, desenvolvimento e maturação do maior número possível de folículos antrais, o evento da superovulação, consiste na aplicação de FSH (hormônio folículo

estimulante), podendo ser de origem pituitária ovina ou suína, em doses decrescentes fracionadas ou em dose única. O procedimento hormonal para promover a ovulação é mediante a aplicação de LH (hormônio luteinizante) entre o décimo quarto (D14) e o décimo quinto dia (D15) do programa hormonal.

Seguem as Tabelas 6-1, 6-2, 6-3 e 6-4 apresentando protocolos diversos para promover múltiplas ovulações em ovinos.

TABELA 6-1. Protocolo de superovulação em ovinos deslanados oriundo do modelo africano com aplicação de FSH em doses decrescentes fracionadas

DIA DO PROGRAMA	HORÁRIO(H)	TRATAMENTO
Zero	7h	Colocação do CIDR
7	7h	Troca do CIDR Aplicar 0,5 mL PGF _{2α}
11	18h	Aplicar 2,0 mL FSH
12	7h 18h	Aplicar 2,0 mL FSH Aplicar 1,6 mL FSH
13	7h 18h	Aplicar 1,6 mL FSH Aplicar 1,2 mL FSH
14	7h 7h 7h 18h	Aplicar 1,2 mL FSH Aplicar 200 UI eCG Retirada do CIDR Aplicar 1,0 mL FSH
15	7h	Aplicar 1,0 mL FSH <i>efeito macho/coberturas</i>
18	7h	Colocação de novo CIDR - Prevenção de regressão prematura dos corpos lúteos
20	7h 15h 15h	Retirada do CIDR Jejum hídrico alimentar Tricotomia/assepsia
21	8h	Colheita dos embriões

Legenda: FSH (Hormônio Folículo Estimulante) eCG (Gonadotrofina Coriônica da Égua Prenhe) CIDR (Controlled Internal Drug Release)

Fonte: Gonzalez et al (2002).

TABELA 6-2. Protocolo de superovulação em ovinos lanados oriundo do modelo africano com aplicação de FSH em doses decrescentes fracionadas

DIA DO PROGRAMA	HORÁRIO(H)	TRATAMENTO
Zero	7h	Colocação do CIDR
7	7h	Troca do CIDR Aplicar 0,5 mL PGF _{2α}
12	7h 18h 18h	Aplicar 2,4 mL FSH Aplicar 2,4 mL FSH Aplicar 240 UI eCG
13	7h 18h	Aplicar 1,8mL FSH Aplicar 1,8 mL FSH
14	7h 18h 18h	Aplicar 1,2 mL FSH Aplicar 1,2 mL FSH Retirada do CIDR
15	7h 18h 18h	Aplicar 1,0 mL FSH Aplicar 1,0 mL FSH <i>efeito macho/coberturas</i>
18	7h	Colocação de novo CIDR - Prevenção de regressão prematura dos corpos lúteos
20	15h	Jejum hídrico alimentar Tricotomia / assepsia
21	8h	Colheita dos embriões

Fonte: Gonzalez (2009).

Nos protocolos contidos nas Tabelas 6-1 e 6-2, a colocação de um terceiro CIDR no dia 18 do programa (D18) tem a finalidade de prevenir a regressão prematura dos corpos lúteos, sendo, este fato, observado em nossos trabalhos de transferência de embriões, principalmente em ovinos da raça Dorper (semi-lanado) e em alguns animais da raça Santa Inês (deslanado) em regiões de clima tropical. A incidência deste fenômeno fisiológico tem maior expressão em caprinos, embora a causa não esteja elucidada. Supõe-se que ocorra um desequilíbrio hormonal que afeta o desenvolvimento normal dos corpos lúteos produzidos em consequência do tratamento superovulatório (BALDASSARRE, 2004). Desta forma, essa conduta é

TABELA 6-3. Protocolo de superovulação em ovinos deslançados com aplicação de FSH em doses decrescentes fracionadas

DIA DO PROGRAMA	HORÁRIO(H)	TRATAMENTO
Zero	7h	Colocação do CIDR
7	7h	Troca do CIDR Aplicar 0,5 mL PGF _{2α}
12	7h 18h	Aplicar 2,4 mL FSH Aplicar 2,4 mL FSH
13	7h 18h	Aplicar 1,8 mL FSH Aplicar 1,8 mL FSH
14	7h 18h 18h 18h	Aplicar 1,2 mL FSH Retirada do CIDR Aplicar 1,2 mL FSH Aplicar 1,0 mL eCG
15	7h 7h 18h 18h	Aplicar 1,0 mL FSH <i>efeito macho</i> Aplicar 1,0 mL FSH <i>efeito macho/coberturas</i>
21	15h	Jejum hídrico alimentar Tricotomia/assepsia
22	8h	Colheita dos embriões

Fonte: Gusmão et al. (2007).

opcional, ficando a critério do médico-veterinário responsável. Uma conduta importante que deve ser adotada pelo menos 60 dias antes do início do tratamento farmacológico de sincronização do estro é a monitoração da frequência do estro nas futuras ovelhas doadoras.

Seleção de doadoras

A seleção de fêmeas como doadoras de embrião deve ter primeiramente como base dois critérios principais, a qualidade de seu genótipo e fenótipo. Em segundo plano, mas não de importância inferior, a ficha reprodutiva de uma ovelha em fase adulta, candidata à doadora, deve conter os seguintes atributos de acordo com a raça: alta produtividade de carne, lã e leite; satisfatório índice de

TABELA 6-4. Protocolo de superovulação em ovinos com aplicação de FSH em dose única

DIA DO PROGRAMA	HORÁRIO(H)	TRATAMENTO
Zero	7h	Colocação do CIDR
12	7h	Aplicar 12,8 mL FSH Aplicar 2,5 mL eCG Misturar as duas doses de hormônios e aplicar na mesma seringa
15	7h 7h	Retirar o CIDR <i>efeito macho</i> /coberturas
21	15h	Jejum hídrico alimentar Tricotomia/assepsia
22	8h	Colheita dos embriões

Fonte: Simonetti et al. (2008).

fertilidade; portadora de habilidade materna; histórico da frequência em sua vida reprodutiva de ciclos estrais regulares; apresentar por ocasião do tratamento superovulatório excelente condição de higiene e condição nutricional classificada como escore três (Figura 6-2). A recomendação técnica da idade da fêmea para o primeiro programa de TE é a partir de dois até os cinco ou seis anos de idade, dependendo de sua condição física e reprodutiva.

Fecundação de doadoras

Se a fecundação das doadoras for pela monta natural, a data e o período da primeira cobertura devem ser controlados e registrados. O *efeito macho* constitui importante ferramenta para a indução do estro das fêmeas após a retirada dos dispositivos vaginais ou implantes subcutâneos na região auricular. Este deve iniciar em torno de dez horas após o final do tratamento com progesterona e pode ser feito pelo próprio reprodutor escolhido para servir à doadora. As montas devem ocorrer no início da observação de estro e no intervalo de oito a doze horas até que as ovelhas não aceitem mais os carneiros. O importante é garantir a fecundação durante as primeiras ondas ovulatórias.



FIGURA 6-2. Ovelhas da raça Santa Inês superovuladas no estado de Sergipe.
Fonte: Gonzalez et al. (2006 b).

No caso da fecundação ser por inseminação artificial, esta deve ser com o auxílio do laparoscópio, prática que somente pode ser executada por médico-veterinário treinado. Podem ser realizadas duas inseminações, a primeira no período de 30 horas e a segunda após 36 horas do início do estro monitorado pelo macho/rufião. Recomenda-se que a qualidade das doses de sêmen precisam ser aprovadas antes da deposição no útero, pela descongelação de uma amostra e avaliação sob microscopia (**10X**) da motilidade individual. Esta deve ter, no mínimo, 30% e vigor escore três. A manipulação do laparoscópio na doadora deve ser executada com bastante critério, evitando, desta forma, um possível traumatismo nos ovários, que nesta fase estão muito aumentados de tamanho e superovulados. Cada corno uterino deve receber uma dose inseminante inoculada na sua curvatura maior.

Colheita de embriões pelo método cirúrgico

A prática de colheita de embriões pelo método cirúrgico deve respeitar as seguintes condutas de segurança com relação à fêmea do-

adora: somente ser executada por médico-veterinário treinado; ter sempre o cuidado da preservação da integridade do genital da fêmea; e a assepsia mais rigorosa possível.

Na espécie ovina, o método cirúrgico é ainda o mais utilizado, em detrimento da estrutura anatômica do canal cervical nestes animais, que é longo, sinuoso, com o posicionamento dos anéis cervicais na forma de um labirinto e diâmetro reduzido, sendo este lato mais acentuado em determinadas raças. Neste método, o recolhimento dos embriões produzidos é executado mediante lavagens sucessivas, aplicando-se PBS (Solução Tampão Dulbeco Modificada) nos cornos uterinos, cujo fluxo imposto pela pressão do líquido possibilita sua recuperação.

As fêmeas devem ser submetidas ao jejum hídrico-alimentar prévio em torno de 15 horas no dia que antecede as cirurgias. Neste dia, devem ser executadas a tricotomia e a assepsia da região abdominal, mediante lavagem com água e detergente neutro e auxílio de uma escova com cerdas de nylon.

O procedimento anestésico é constituído da associação de dois princípios farmacológicos, o cloridrato de xilazina na dose de 1,1 mg/kg/peso vivo, podendo ser administrado pelas vias endovenosa ou intramuscular, e o cloridrato de ketamina na dose de 5 a 15 mg/kg/peso vivo, administrado por via intramuscular. Outra sedação alternativa é a entubação com halotano, método mais indicado em ovinos. Após a anestesia da ovelha, esta é colocada em cama de contenção reclinável (Modelo Figura 6-3) na posição de decúbito dorsal e inclinação de 45 graus para a realização da laparotomia, depois retorna para a posição horizontal e desse modo é mantida durante o processo de recolhimento embrionário.

A assepsia do campo operatório segue seguintes passos: lavar com água e detergente neutro; enxugar com pano cirúrgico estéril; e usar solução de álcool iodado a 10%, sendo esta pincelada com gaze estéril fixada em uma pinça, da parte medial do abdomen até a região da virilha.

A avaliação da resposta superovulatória deve ser realizada por laparoscopia, mediante duas incisões com comprimento em torno de 1 cm cada, laterais à linha alba, uma à esquerda para a introdução da fonte ótica e outra à direita para a introdução do bastão de inox que possibilita a manipulação de cada corno individual para visualização dos corpos lúteos formados. Esta conduta evita a abertura de cavidade quando a resposta ovariana for negativa. No caso de

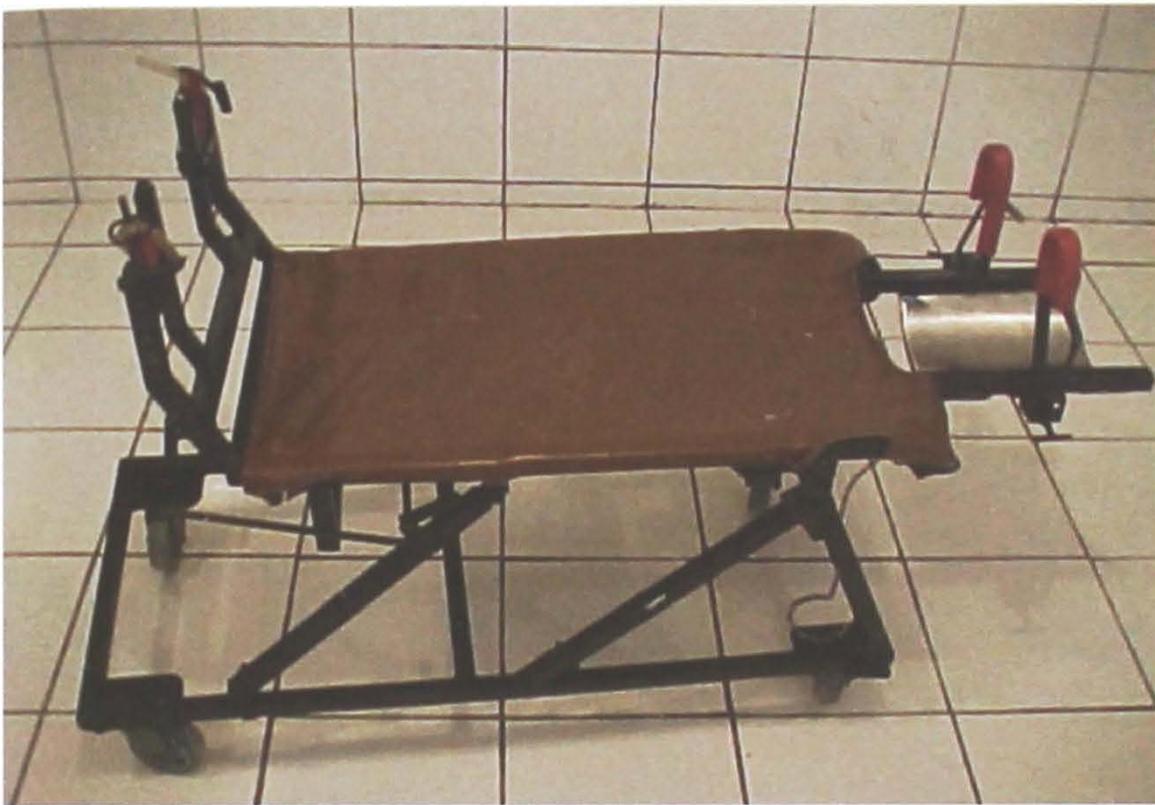
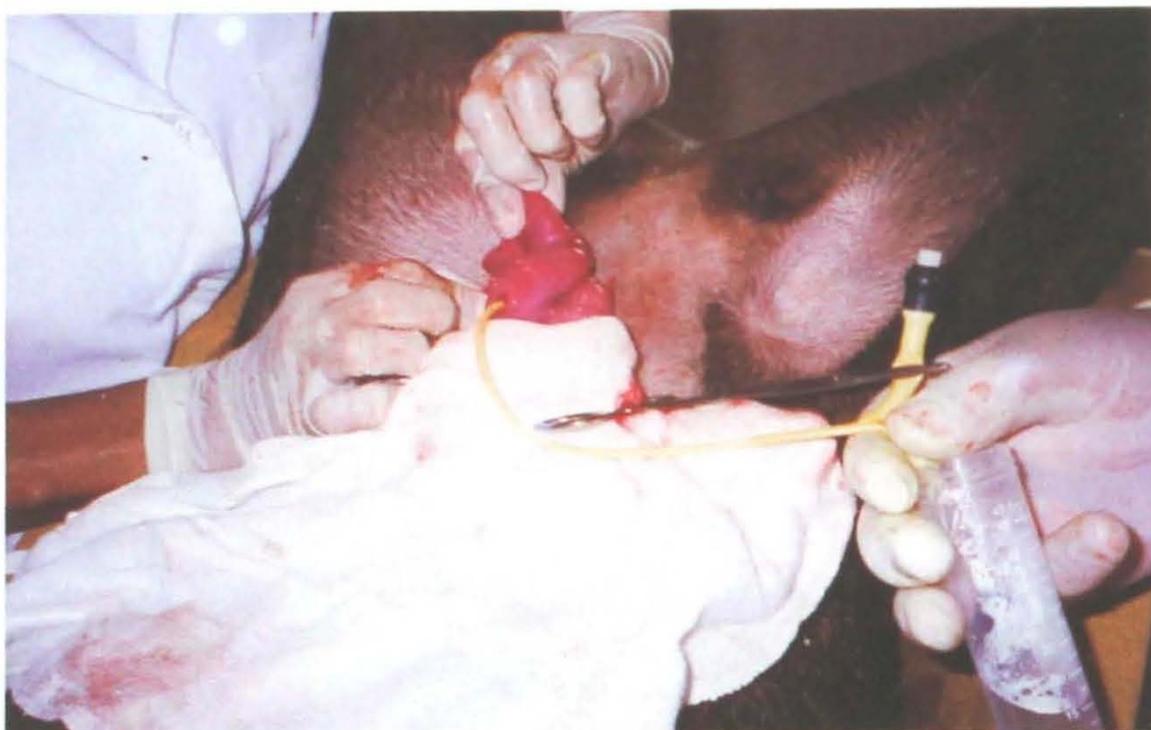


FIGURA 6-3. Modelo de cama de contenção para a colheita cirúrgica de embriões em ovinos. Fonte: Gonzalez et al. (2006 b).

resposta positiva, é feita a incisão da cavidade abdominal na altura da linha alba em torno de 2 a 3 cm, sendo que cada corno uterino deve ser exteriorizado e lavado individualmente.

A solução de lavagem deve ser enriquecida com 1 a 5% de soro fetal bovino, sendo utilizado um volume de 60 mL por corno e este dividido em três aplicações de 20 mL. O procedimento de recuperação dos embriões consiste na inoculação do líquido por um catéter fino (tipo sonda de Jelco® – 21G) posicionado no início da junção istmo-tubárica em direção ao corpo do útero (Figura 6-4) e este recuperado através de uma sonda de Foley (número 8) com uma das vias introduzida à frente da bifurcação uterina (Figura 6-5) e a outra via permanece dentro de uma placa de petri de tamanho 35 x 10 mm para recolhimento direto do líquido (Figura 6-6).

Após a abertura da cavidade abdominal recomenda-se a introdução no seu interior de 500 mL de solução fisiológica e durante todo o procedimento da lavagem, o útero também deve ser constantemente umidificado com a mesma solução por um assistente. Esta conduta tem por finalidade minimizar as aderências ocasionadas no sistema genital da fêmea, acarretadas pelo manuseio cirúrgico.



▼
FIGURA 6-4. Local da perfuração à frente da bifurcação uterina em direção ao corno uterino esquerdo e a introdução de uma das vias da sonda de foley para recolhimento do meio. Fonte: Gonzalez et al. (2002).



▼
FIGURA 6-5. Local de perfuração na junção istmo tubárica com a introdução da sonda jelco para a inoculação do meio de lavagem. Fonte: Gonzalez et al. (2006 b).

dado com as fêmeas. Nesses animais, o canal cervical é longo, sinuoso, de diâmetro muito fino e com anéis cartilagosos dispostos de maneira desigual, muitas vezes não possibilitando a execução desta prática.

Quando possível a transposição do canal cervical, a colheita de embriões, deve ser praticada por profissional treinado e com habilidade própria, pois, ao forçar a penetração do catéter, sem o perfeito conhecimento do trajeto anatômico do sistema genital da fêmea, pode ocorrer o rompimento do útero ou o fundo do saco vaginal. Isso ocorre porque a vagina da ovelha contém pregas que podem produzir espaços cegos ao redor da entrada da cérvix, formando uma falsa via e estas agressões físicas podem causar sangramentos severos e endometrites agudas nas ovelhas (HALBERT et al.1990).

Nas fêmeas ovinas em que o canal cervical apresenta os anéis dispostos de forma mais uniforme, pluríparas e com o uso de substâncias com função dilatadoras, existe a possibilidade da penetração do catéter acoplado em uma sonda para a inoculação do líquido de lavagem. Com o objetivo de promover a dilatação do canal cervical de ovinos algumas condutas terapêuticas têm sido adotadas. Em ovinos das raças Santa Inês e Dorper é recomendado o uso de 50 µg de cloprostenol aplicado na submucosa do vestibulo vaginal, no período de 12 horas antes da colheita, ou de 200 µg de misoprostol, análogo sintético da prostaglandina E₁ dissolvido em solução fisiológica e infundido no fórnix vaginal, cinco horas antes da mesma. Estes procedimentos proporcionam a dilatação satisfatória da cérvix, a taxa de recuperação do meio de lavagem apresenta-se em torno de 95,7% e média de 6,0 estruturas embrionárias. Entretanto, mesmo utilizando-se ovelhas que tenham no mínimo uma ordem de parto e com o auxílio de agentes terapêuticos com efeito dilatador do conduto cervical, existe grande variação no grau de complexidade entre indivíduos de um mesmo grupo racial (GUSMÃO et al., 2007; 2009).

A primeira etapa para o procedimento começa em submeter os animais no dia anterior à colheita dos embriões a uma alimentação leve à base de forragens verdes, somente no período da manhã. No dia do trabalho realizar a assepsia da região perianal e vulvar com água e detergente neutro e depois enxugar com papel toalha descartável. Seguido este processo a fêmea será contida em tronco próprio. A anestesia recomendada é uma epidural baixa, com aplicação de 1 mL de lidocaína a 2% na região sacrococcígena, possibilitando a posição em estação da fêmea durante todo o procedimento.

A próxima etapa consiste na introdução na vagina de um espéculo modelo bico de pato do tipo francês com fonte luminosa para visualização da entrada do canal cervical. O tracionamento deste será com o auxílio de duas pinças Modelo Allis ou Pozzi (comprimento entre 20 a 25 cm), nas duas bordas laterais da cérvix até o mais próximo possível da entrada do vestíbulo vaginal, com a finalidade de deslazer os anéis e possibilitar o acesso no canal. Durante todo o procedimento, as duas pinças permanecem contidas nesta posição por um assistente. Com uma vela tipo Hegar número três, o canal cervical é transposto e dilatado mecanicamente a fim de permitir a passagem do catéter de colheita. A inoculação do meio de lavagem pode ser realizada com uma sonda desprovida de balão com via única do tipo Nelaton-Robinson[®] com dois orifícios laterais, Rush (número 220500 – tamanho 10). No momento em que a sonda estiver perfeitamente introduzida dentro de um dos cornos com o auxílio de um mandril de aço inoxidável, este é retirado. A sonda é acoplada a um equipo com duas vias. O meio de lavagem (PBS) é enriquecido de 0,5% de surfactante, pré-aquecido e mantido em banho-maria, a 37°C, durante todo o procedimento. Por uma das extremidades, 240 mL são inoculados em alíquotas de 20 mL em cada corno uterino, os quais são lavados individualmente, totalizando 480 mL por animal. Pela outra extremidade, a solução é recolhida em filtro coletor, e esta é depositada em volumes de 20 mL em placas de petri para a avaliação no estereomicroscópio das estruturas embrionárias recuperadas. Este sistema de circuito fechado proporciona um microambiente estéril e asséptico aos embriões (Figura 6-7).

Ao término do trabalho, recomenda-se a infusão no canal vaginal de soluções antibacterianas, com o objetivo de prevenir possíveis contaminações ocasionadas pela manipulação mecânica das pinças utilizadas para o tracionamento da cérvix e aplicação de 50 µg de cloprostenol via submucosa do vestíbulo vaginal.

Classificação de embriões

A primeira etapa é a identificação dos embriões. Esta deve ser realizada no estereomicroscópio em aumento de 10 a 20x. Depois os embriões são transferidos para placas com quatro cavidades preenchidas com meio holding pré-aquecido à temperatura de 37°C para a contagem



FIGURA 6-7. Inoculação e recolhimento do meio de lavagem em circuito fechado. Observar tronco de madeira próprio para este procedimento. Fonte: Gusmão e Moura (2005).

e classificação em aumento de 40x. O critério para a avaliação dos embriões fundamenta-se no seu estágio de desenvolvimento, morfologia e integridade da zona pelúcida.

Classificação da morfologia embrionária – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998):

Grau 1: Possui uma massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade, e têm forma regular. A zona pelúcida não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa, preferencialmente intacta. Células extrusadas da massa celular do embrião compreendem menos de 15% do material celular total.

Grau 2: Forma regular, zona pelúcida intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Células extrusadas da massa celular do embrião compreendem mais de 15% do material celular. Pelo menos 50% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.

Grau 3: Irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, na cor e na densidade das células individuais. Menos de 75% das células degeneradas. Pelo menos 25% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.

Grau 4: Massa embrionária menor que 25% de todo material celular presente no interior da zona pelúcida, ovócitos ou estruturas unicelulares degeneradas.

Durante a avaliação, considerar a simetria e o tamanho dos blastômeros, a compactação (coesão) entre estes, a coloração e vacuolização. Embriões com blastômeros assimétricos, despreendidos da massa principal, vacuolizados, com coloração excessivamente clara ou escura, com ruptura da zona pelúcida ou esta perdida e com estágio de desenvolvimento atrasado, apresentando menos de 16 células, possuem menor possibilidade de serem viáveis.

Os embriões recebem as seguintes denominações quanto ao seu estágio de desenvolvimento: mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e eclodido.

Seleção e preparo das receptoras

A escolha das fêmeas receptoras dos embriões exige o controle de alguns critérios sanitários, nutricionais e reprodutivos, sendo 50% da taxa de sobrevivência embrionária a elas atribuídas. Estas possuem o compromisso de levar a gestação a termo e ter capacidade de amamentar e cuidar socialmente das crias nascidas.

Os critérios de seleção podem ser enumerados da seguinte forma: obter informações sobre a região de origem das fêmeas, se indenes, da ocorrência de doenças infecto-contagiosas e surto de aborto; no momento da escolha avaliar a condição corporal, uma vez que o tamanho da receptora deve ser compatível com o desenvolvimento do(s) feto(s) oriundo(s) de pais biológicos de grande porte e a capacidade de ter parto normal; confirmar o histórico positivo destas fêmeas em relação à ocorrência de partições fisiológicas anteriores; se portadoras de habilidade materna; devem apresentar satisfatória condição sanitária; não selecionar fêmeas nulíparas ou velhas com idade acima de seis anos; devem apresentar correta inserção de úbere, apresentando os dois tetos funcionais.

O preparo das ovelhas receptoras deve adotar os seguintes cuidados técnicos:

- 1. Manejo reprodutivo** – Manter o lote das receptoras selecionadas separadas do resto do rebanho, em piquete utilizado para animais reserva para receber embrião. As receptoras devem ficar isoladas dos machos. Transcorridos os primeiros 30 dias da chegada destes animais à propriedade, inicia-se a monitoração da frequência dos ciclos estrais por meio de *efeito macho*, no intervalo de 60 dias que antecedem a aplicação do protocolo hormonal para a sincronização do estro.
- 2. Manejo sanitário** – Controle da incidência de parasitas gastrointestinais por meio de exames de fezes para identificação e quantificação de ovos por grama. O tratamento terapêutico deverá ser estratégico em função do caso clínico. Executar um calendário de vacinações preventivo para a ocorrência de clostridium, linfadenite caseosa, raiva e, caso seja necessário, contra a leptospirose. Disponibilizar pessoal de apoio somente para o manejo diário destes animais, fornecer alimentação, controlar a ocorrência de doenças comuns à espécie, observar sempre as condições dos cascos e membros e alguma alteração de comportamento individual.
- 3. Manejo nutricional** – Manter as receptoras em pastagem de alto valor nutricional e com sal mineral *ad libitum*. No período de 30 dias que antecede o início do tratamento hormonal, aplicar *flushig* (Capítulo 8) com suplemento energético-proteico equilibrado e enriquecido com vitaminas e aminoácidos essenciais. Se os animais encontram-se em condições nutricionais diferenciadas, utilizar manejo descrito no Capítulo 8. A condição nutricional da receptora (Figura 6-8) influencia na taxa de ovulação e possibilita maior sobrevivência do embrião.
- 4. Reserva de receptoras** – Dependendo da intensidade de realização de transferência de embriões, a fresco ou criopreservados, na propriedade, é preciso ter sempre um número reserva de receptoras para o preparo e eventual necessidade de substituição dos animais, mesmo em programas em andamento. Para cada doadora superovulada serão necessárias dez receptoras prontas, sendo que esta proporção é no caso da inovulação de dois embriões. Se a transferência for de um único embrião o número de receptoras deverá ser 20. Outra justificativa importante em ter à disposição um número adicional é que as fêmeas



FIGURA 6-8. Fêmeas preparadas para receberem embrião a fresco em Sergipe.
Fonte: Gonzalez et al. (2006 b).

receptoras somente podem ser utilizadas com eficácia em um único programa, em virtude da resposta ovariana para formação de corpo lúteo funcional não ser satisfatória em programas sequenciais.

5. Protocolo hormonal para sincronização de estro – O protocolo para a sincronização de estro das receptoras apresentado na Tabela 6-5 é compatível com o protocolo de superovulação de doadoras exposto na mesma.

A retirada do dispositivo vaginal impregnado com progesterona natural ou sintética no protocolo de receptoras deve ser no intervalo de 12 horas antes da retirada deste na doadora. Este procedimento maximiza a sincronia de estro entre doadora/receptora, ou seja, sincronismo entre a idade dos embriões e o estágio fisiológico uterino das receptoras. Com a finalidade de garantir a sobrevivência do embrião depois de sua transferência para o útero, o seu estágio fisiológico deve estar mais avançado em relação ao do útero receptor. Desta forma, haverá um tempo extra para a síntese das proteínas trofoblásticas. O embrião ovino produz uma proteína de-

TABELA 6-5. Tratamento hormonal para fêmeas ovinas receptoras de embrião

DIA DO PROGRAMA	HORÁRIO(H)	TRATAMENTO
Zero	7h	Colocação de dispositivo vaginal progesterônico
13	19h	Retirada da esponja Aplicar 400 UI eCG
15	7h	Observação do estro <i>efeito macho</i>
20	18h	Jejum hídrico alimentar
21	8h	Inovulação

Fonte: Gonzalez et al.(2002; 2003) e Soares ; Gonzalez (2007).

nominada proteína trofoblástica ovina, o interferon tau ovino. Esta proteína começa a ser secretada a partir do oitavo dia, com aumento significativo entre os dias 12 e 13 até o 21º de vida do embrião, sendo responsável por inibir o processo luteolítico e o reconhecimento materno da gestação.

Inovulação

O termo inovulação consiste tecnicamente na deposição do embrião no útero de uma fêmea receptora. Na espécie ovina a transferência de embriões é executada com o auxílio de laparoscópio, sendo considerada mista. Este método possibilita a avaliação dos ovários, a exposição da junção útero-tubárica, ipsilateral ao ovário que apresenta o corpo lúteo funcional de melhor qualidade.

Para o procedimento das inovulações, as fêmeas receptoras são submetidas a um jejum hídrico-alimentar prévio de 12 horas. No dia anterior à cirurgia é feita a tricotomia e assepsia da região paramamária pela lavagem com água e detergente neutro e auxílio de escova com cerdas de nylon. A analgesia é feita com a administração endovenosa de cloridrato de xilazina na dose de 1,1 mg/kg de peso vivo. O animal sedado é colocado em cama de contenção reclinável (conforme Modelo mostrado anteriormente na Figura 6-4) e mantido na posição de decúbito dorsal, com inclinação de 45 graus.

Executa-se a assepsia do campo operatório com solução de álcool iodado a 10%, sendo esta pincelada com gaze estéril fixada em uma pinça na parte medial do abdômen. Segue a realização de duas incisões laterais à linha alba, para a abertura da cavidade abdominal, uma à esquerda em torno de 1 cm para a introdução da fonte ótica e outra à direita em torno de 2 cm para a exteriorização da junção útero tubárica, com o auxílio de uma pinça do tipo Babycook, ipsilateral ao ovário contendo pelo menos um corpo lúteo de boa qualidade.

A inovulação é na altura da porção medial da tuba uterina, local natural de um embrião com idade em torno de seis dias, através da injeção com um catéter capilar do tipo Tomcath® ou similar (Figuras 6-9, 6-10 e 6-11). No final do processo cirúrgico, os animais recebem antibiótico de amplo espectro, cloridrato de oxitetraciclina na dose de 1 mL/10 kg/peso vivo.

O número de embriões inovulados (um ou dois) não interfere na taxa de sobrevivência destes, porém o peso ao nascer de produtos oriundos de partos simples é significativamente maior que os de partos duplos. Este fato tem relevância no que diz respeito ao manejo das crias nascidas, sendo comercialmente insatisfatório. O

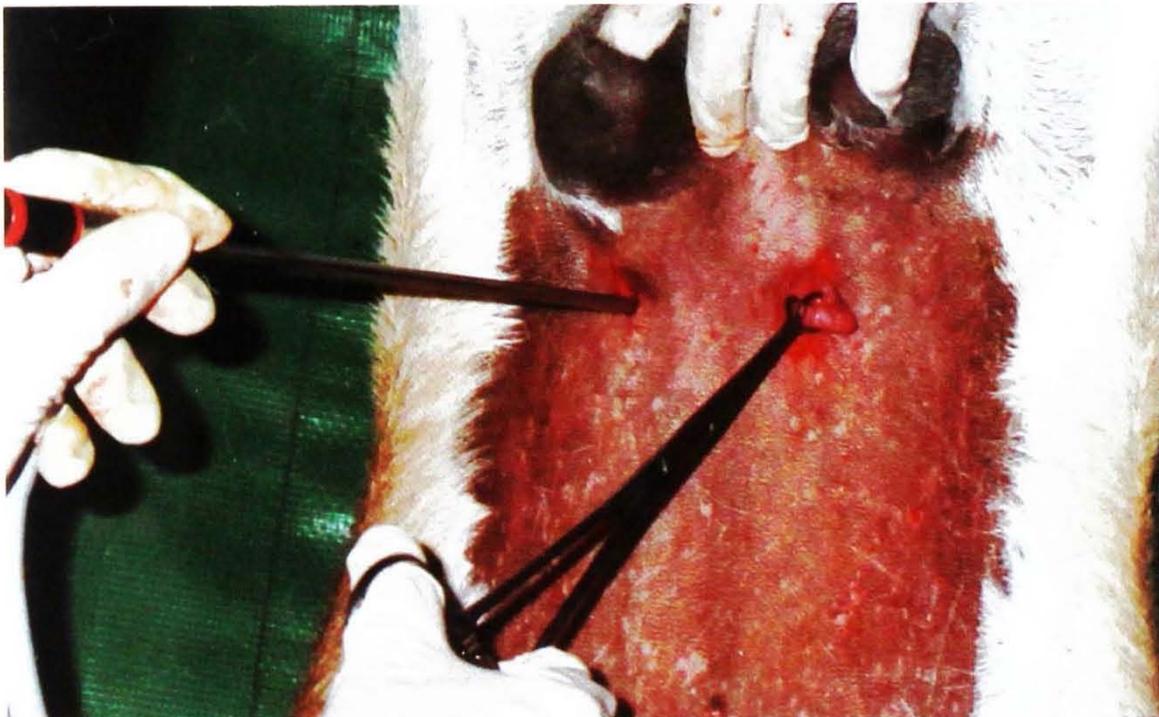
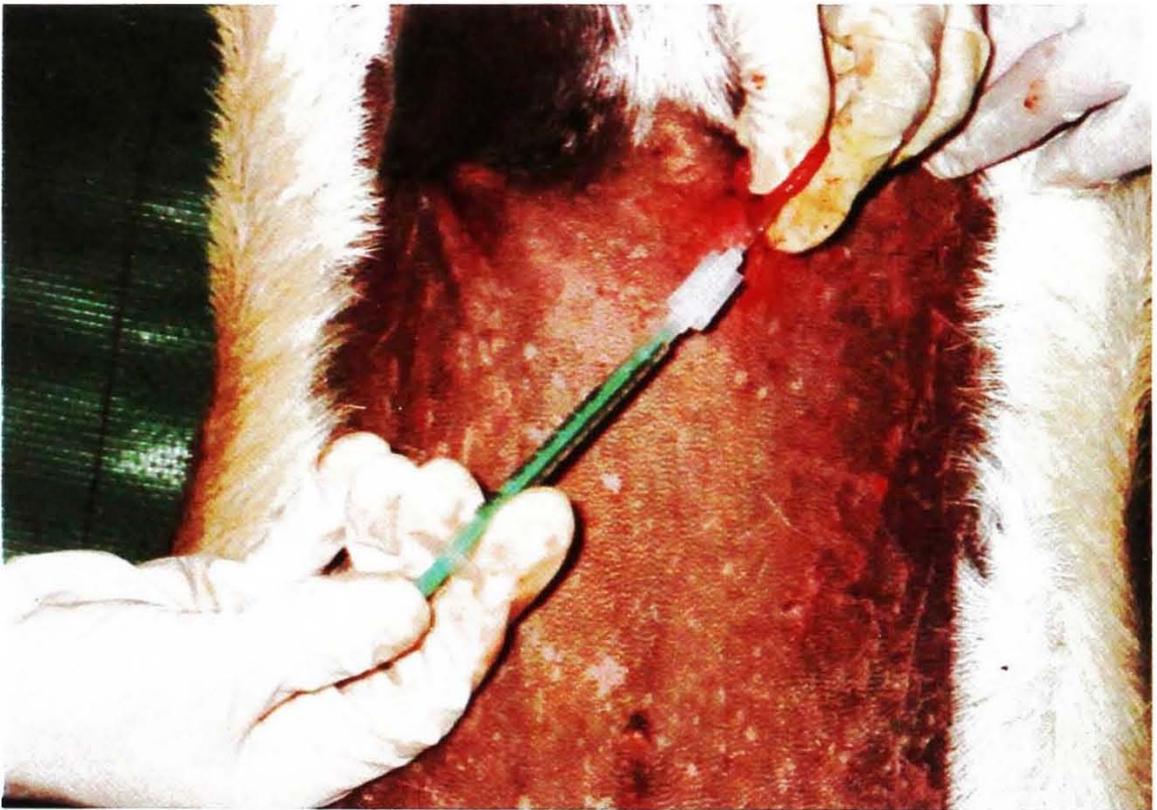


FIGURA 6-9. Exteriorização da porção medial da tuba uterina direita. Fonte: Gonzalez et al. (2005).



▼
FIGURA 6-10. Perfuração da porção medial da tuba uterina direita. Fonte: Gonzalez et al. (2005).



▼
FIGURA 6-11. Inovulação na porção medial da tuba uterina direita. Fonte: Gonzalez et al. (2005).

nascimento de produtos com o peso muito abaixo da média pode comprometer o seu desenvolvimento na vida adulta.

Com relação à idade que os embriões são inovulados, estes em estágio de blastocisto apresentam melhores resultados de sobrevivência. Um total de 222 embriões ovinos das raças Dorper e Damara, em diferentes estágios fisiológicos, foram inovulados e as taxas de sobrevivência foram as seguintes: estágio de blastocisto, 49,15% (29/59); seguidos de 33,33% (1/3) para blastocisto inicial; 28,12% (18/64) para blastocisto expandido; e 11,1% (1/9) para mórula. Neste contexto, das 101 receptoras ovinas que receberam 202 embriões da raça Dorper, 70 ficaram prenhes (69,30%), 40 fêmeas apresentaram partos simples (57,14%) e 30 partos duplos (42,86%). A frequência de partos simples é maior. Dez receptoras receberam 20 embriões ovinos da raça Damara, conferindo 90,0% de parição, com 14 crias nascidas (GONZALEZ et al., 2003 ; SOARES et al., 2002; SOARES; GONZALEZ, 2007).

Congelação de embriões

A congelação de embriões favorece a sua importação e exportação, dispensando o transporte de animais e suas implicações: transferência de embriões para fêmeas em estro natural; preservação de embriões colhidos excedentes; adequação da época de partos, independentemente da data da colheita dos embriões; formação de banco de germoplasma de animais portadores de genética superior ou de raças em perigo de extinção; comercialização, transporte e disseminação de material genético entre produtores, regiões e países com o mínimo de risco de introdução e/ou disseminação de doenças (SIMPLÍCIO; SANTOS, 2000).

Na espécie ovina, basicamente dois métodos de congelação de embriões são utilizados. Para a execução do método clássico (lento) é necessário ter um equipamento especial de criopreservação automática. Este exige a redução gradativa da temperatura ambiente até -35°C no período de uma a duas horas, na solução com o crioprotetor (GONZALEZ et al., 2005).

Atualmente, a vitrificação, método conhecido como ultrarrápido, está sendo o mais adotado entre pesquisadores e médicos-veterinários, em virtude de ser eficaz, rápido e de fácil execução, pois envolve a exposição dos embriões a altas concentrações de crioprotetor

em placas do tipo *minic*, seguido da imersão direta em nitrogênio líquido, sem a necessidade de um congelador programável de alto custo como no método clássico.

No mecanismo de criopreservação de qualquer tipo de célula ou tecido, o efeito mais crítico é a formação de cristais de gelo a partir da água existente nos espaços intra e extracelulares. À medida que estes cristais se formam, eles adquirem formas e tamanhos irregulares. Esse efeito acarreta um rearranjo nas microestruturas e organelas da membrana biológica dos blastômeros, às vezes de forma irreversível, interferindo na funcionalidade celular e, principalmente, na permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas (MAZUR, 1970; FAHY et al., 1987).

As substâncias conhecidas como crioprotetores, que são solutos orgânicos, são adicionadas aos extensores com a função de proteger as organelas intracelulares dos efeitos críticos pela exposição ao frio, removendo ou substituindo a água intracelular e conferindo proteção aos longos períodos de estocagem em nitrogênio líquido (DOBRINSKY, 2002).

Dependendo da capacidade de penetração dessas substâncias na membrana plasmática, elas são classificadas como crioprotetores intra e extracelulares. Os de ação intracelular de maior uso são os seguintes: etilenoglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, propanodiol, butanodiol e metanol. Eles possuem moléculas relativamente pequenas (REINCHENBACH et al., 2001).

O mecanismo de ação protetora dessas substâncias é atribuído às suas propriedades coligativas e ligantes com a água, reduzindo o ponto crioscópico intracelular. Desta maneira, ocorre o aumento do volume de água que permanece em estado líquido sob baixas temperaturas, reduzindo a concentração intracelular de solutos e os danos causados pela solução (HOLT, 2000).

Durante todo o procedimento criobiológico, os crioprotetores permeáveis ou não permeáveis reagem com os fosfolipídeos que compõem a membrana celular e permanecem integrados a estes, proporcionando estabilização à membrana e preservando, desta forma, a viabilidade do embrião após a descongelação (SANTIN et al., 2009).

Um ponto importante a ser considerado é a toxicidade dessas substâncias ao embrião. A concentração máxima permitida é de 1 a 2 M. O etilenoglicol é o crioprotetor intracelular menos tóxico, seguido pelo glicerol e o propilenoglicol. Os crioprotetores extracelulares são compostos por macromoléculas e açúcares e atuam por

meio de mecanismo osmótico, ocasionando a desidratação celular controlada durante todo o procedimento criobiológico, impedindo a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula. Os mais usados são a lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona, manitol e trealose (NIEMANN, 1991; RUMPF et al., 2000).

Congelação lenta – método clássico

No método clássico recomenda-se o uso de etilenoglicol como substância crioprotetora intracelular. Esta apresenta maior ação penetrante e menor toxicidade ao embrião e isto possibilita sua adição em uma única etapa, método conhecido como *one-step*, não necessitando ser removido após a descongelação.

As etapas da congelação em equipamento automatizado são as seguintes:

1. Os embriões classificados como grau I e mantidos em meio de manutenção Holding;
2. Os embriões são transferidos para um meio de etilenoglicol 1,5 M, permanecendo neste por 5 a 10 minutos;
3. O envase dos embriões é feito em palhetas de 0,25 mL;
4. Período de equilíbrio em temperatura ambiente durante 5 minutos;
5. As palhetas são transferidas para a máquina de congelação programada na temperatura de -6°C e são equilibradas durante 5 minutos;
6. Curva de resfriamento: de 25°C a -6°C a $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$
7. *Seeding* – Significa a indução da cristalização por meio extracelular antecedendo a congelação do meio contendo os embriões e protegendo-os das injúrias do choque térmico. O local correto para este procedimento é no menisco superior da coluna central da palheta. É executado com uma pinça reta, previamente resfriada por imersão no nitrogênio líquido.
8. Equilibrar durante 10 minutos;
9. Curva de congelação: de -6°C a -35°C a $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ de -35°C a -38°C a $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$
10. Equilibrar durante 2 minutos;
11. Armazenar no nitrogênio líquido.

As etapas da descongelação são as seguintes:

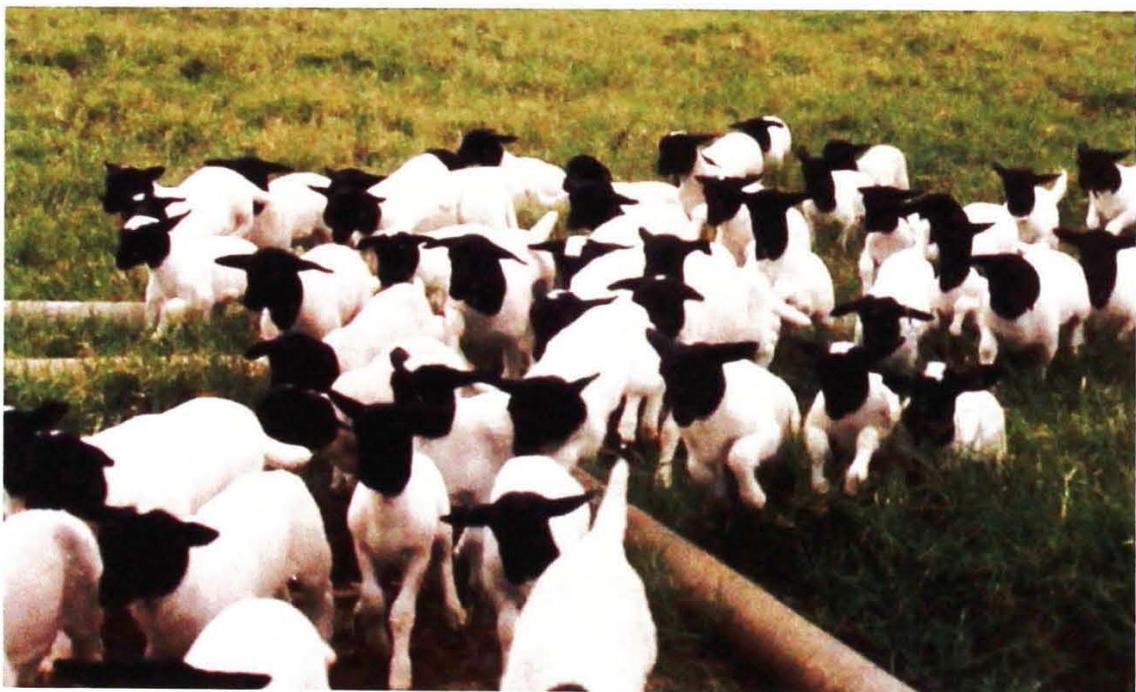
1. Retirar as palhetas do nitrogênio líquido e manter em temperatura ambiente por 7 segundos;

2. Colocar as palhetas em banho-maria a 35°C por 25 segundos;
3. Secar a palheta, identificar o número, manter na posição horizontal e cortar o selador fixado na sua parte final;
4. Conectar uma seringa de 1 mL com adaptador (venocath 2,0/14G)
5. Depositar o conteúdo da palheta em meio *holding*, fazer a primeira lavagem, observar os embriões e depois lavar novamente em meio novo;
6. Transferir os embriões para a receptora.

A Figura 6-12 apresenta cordeiros da raça Dorper criopreservados pelo método clássico, nascidos no estado da Paraíba, oriundos de embriões importados da África do Sul no ano 2000.

Congelamento ultrarrápida – vitrificação

A vitrificação significa que os meios utilizados na congelação sofrem uma passagem direta do estado líquido para um estado vitrificado e amorfo, sem a ocorrência da sua cristalização. Este fenômeno ocorre em virtude do alto grau de viscosidade da solução composta pelas substâncias crioprotetoras e da máxima velocidade de criopreservação, ocasionada por sua imersão direta em nitrogênio líquido. Os



▼
FIGURA 6-12. Cordeiros da raça Dorper oriundos de embriões importados da África do Sul. Fonte: Gonzalez et al.(2003).

fatores limitantes dessa técnica são citados como o estresse osmótico e a toxicidade química dos crioprotetores, que podem acarretar injúrias na microestrutura dos embriões. Entretanto, a possibilidade de aceleração na curva de resfriamento apresenta a vantagem do uso de concentrações reduzidas de substâncias crioprotetoras com ação intracelular. Este fato proporciona a diminuição dos efeitos do estresse osmótico e tóxicos, menor ocorrência de injúrias frente ao frio, uma vez que a célula embrionária passa rapidamente para o estado vítreo (PAPADOPOULOS et al., 2002; GREEN, 2005; REINCHENBACH et al.; 2008).

Protocolos utilizados para vitrificação de embriões ovinos

1. Protocolo utilizado no Canadá, segundo Baldassarre (2004)

Etapas do procedimento de vitrificação:

- A. **Preenchimento da palheta:** 100 µl de sacarose a 0,5 M – 20 µl de ar – 6 µl de solução EFS (40% de etilenoglicol + 18% de Ficoll 70 + 0,3 M de sacarose em PBS com 5% de soro fetal bovino e 1% de albumina Sérica) – 6 µl de ar – 40 µl de EFS – 6 µl de ar.
- B. **Período de equilíbrio:** Colocar os embriões em solução de equilíbrio (20% de etilenoglicol em PBS com 5% de soro fetal bovino e 1% de albumina sérica) durante cinco minutos.
- C. **Solução de vitrificação:** Colocar os embriões dentro da coluna com 40 µl da solução de vitrificação.
- D. **Preenchimento:** 6 µl de EFS – 15 µl de ar – 20 µl de sacarose a 0,5 M.
- E. **Vitrificação:** Imersão rápida em nitrogênio líquido da porção da palheta contendo EFS e depois lentamente a porção que contém a solução de sacarose, completando a vitrificação.

Etapas do procedimento de desvitrificação:

- A. Colocar as palhetas em banho-maria a 25°C durante 10 segundos.
- B. Secar a palheta e depositar o conteúdo em solução de sacarose a 0,5 M.
- C. Os embriões são lavados nesta solução durante um minuto.
- D. Transferir os embriões para outra solução de sacarose a 0,5 M e lavar durante quatro minutos.
- E. Transferir os embriões para a solução Tampão Dulbeco modificada com 20% de soro fetal bovino e 1% de albumina sérica.
- F. Transferir os embriões para as receptoras.

Segundo o autor, uma vez que os protocolos de vitrificação sejam seguidos corretamente e ajustados, as porcentagens das taxas de gestações apresentam-se em torno de 40 a 50%, resultado este similar as obtidas com embriões congelados pelo método convencional.

2. Protocolo utilizado na Austrália¹

Etapas do procedimento de vitrificação: neste protocolo trabalha-se em uma placa do tipo *multi* com quatro poços.

- A. O poço um é preenchido com 800 μ l de meio Holding – os embriões permanecem neste poço no mínimo cinco e no máximo 40 minutos.
- B. O poço dois é preenchido com 800 μ l de meio Holding – aqui são lavados e seguem para o poço três.
- C. O poço três é preenchido com 800 μ l de meio Holding + 100 μ l de Etilenoglycol + 100 μ l de Dimetilsulfóxido – aqui permanecem durante três minutos.
- D. O poço quatro é preenchido com 700 μ l de sacarose + 200 μ l de etilenoglycol + 200 μ l de dimetilsulfóxido – final do processo de vitrificação – imersão direta em nitrogênio líquido.

Etapas do procedimento de desvitrificação:

- A. Colocar as palhetas em banho-maria a 25°C durante 10 segundos.
- B. Secar a palheta e depositar o conteúdo em solução de sacarose a 0,5 M.
- C. Os embriões são lavados nesta solução durante um minuto.
- D. Transferir os embriões para outra solução de sacarose a 0,5 M e lavar durante quatro minutos.
- E. Transferir os embriões para as receptoras.

Congelamento de sêmen

7



Métodos para colheita de sêmen

O método de vagina artificial é o mais difundido e correto, por proporcionar a produção de amostras de sêmen dentro dos parâmetros fisiológicos. Apresenta, também, a vantagem de ser mais rápido quando empregado em carneiros adequadamente treinados. A sua aplicação pode ser em colheitas seriadas, pelo menos três vezes na semana, sendo esta possibilidade de grande interesse em animais destinados a doar sêmen nas centrais para o armazenamento ou em serviço sexual intensivo de inseminação artificial realizada a campo.

O processo de adestramento tem o objetivo de reforçar os reflexos condicionados do animal que conduzem ao cortejo, à monta, à penetração e à ejaculação. Devemos considerar a interação homem/animal e treinar, no mínimo, dois operadores para esta prática, visando possível ausência de um. De forma que isso não seja uma condição comportamental negativa e acarrete um desempenho desfavorável do carneiro. Para o condicionamento do salto, caso não tenham fêmeas em estro natural disponíveis, 2 mg de benzoato de estradiol podem ser aplicados, via intramuscular, em ovelhas destinadas à função de manequim. Quando os machos estiverem perfeitamente treinados, o manequim pode ser qualquer ovelha mansa, pois a estimulação para o salto será em função da imobilidade da mesma.

Os doadores de sêmen devem ser mantidos em bom estado sanitário e nutricional, uma vez que estas condições podem influenciar a libido, a espermatogênese e, por consequência, a qualidade do sêmen produzido. A tosquia e a assepsia da região do prepúcio devem ser efetuadas nos carneiros lanados, no sentido de minimizar possíveis contaminações do ejaculado.

A vagina artificial é uma imitação da vagina natural da fêmea, que mediante estímulo térmico e mecânico, desencadeia a ejaculação. Por isso, o modelo escolhido deve atender às exigências anatômicas e fisiológicas do animal (Figura 7-1). A temperatura da água deve estar entre 40°C e 42°C, e pressão moderada ocasionada pelo ar insuflado entre as paredes formadas pelo tubo rígido e a mucosa de látex.

No método por eletroejaculação, o sêmen é obtido por meio de um estimulador elétrico. A sonda introduzida no reto possui mais de dois eletrodos e proporciona descargas entre 4 e 15 volts. Se a técnica for conduzida corretamente, a qualidade do ejaculado pode apresentar características similares ao obtido por vagina artificial. Entretanto, pela intensificação dos estímulos sobre as glândulas



▼
FIGURA 7-1. Momento da colheita de sêmen com vagina artificial. Fonte: Gonzalez et al.(2006 b)

anexas, o sêmen pode não se enquadrar nos parâmetros fisiológicos verdadeiros comuns à espécie e, de forma acidental, contaminar-se com urina.

Recomenda-se um intervalo quinzenal para execução desta prática, com o objetivo de preservar o bem-estar do animal. A mesma prática somente deve ser adotada para o caso de carneiros impossibilitados de realizar a monta ou animais que apresentem comportamento agressivo e/ou muito rústicos. A metodologia pode ser executada com o animal contido em pé (Figura 7-2) ou contido no solo na posição lateral. O animal deve ser colocado em posição sentada e manualmente desfaz-se o S peniano, a glândula é liberada e presa em sua base por meio do enlace de uma gaze estéril e, retorna-se o mesmo para a posição lateral. A sonda lubrificada com gel de uso em ultrassonografia é introduzida no reto com cuidado na mucosa em profundidade de 10 cm a 20 cm (dependendo do tamanho do indivíduo). Um copo coletor de vidro graduado, limpo e estéril, é acoplado na glândula para que o sêmen seja obtido diretamente dentro do mesmo. Um operador mantém pressionada a sonda no solo da pélvis,



FIGURA 7-2. Colheita de sêmen por eletroejaculação com o carneiro contido em pê.
Fonte: Gonzalez et al.(2006 b).

sobre as glândulas anexas, a fim de estimular a ereção. São aplicados de 3 a 5 estímulos elétricos com intensidade curta no período de 1 a 2 segundos, com intervalo de 5 segundos entre os estímulos. Este procedimento tem a finalidade de evitar o excesso de secreção das glândulas acessórias. Em seguida, aplicam-se 1 a 3 estímulos mais longos, entre 5 a 10 segundos, para estimular a ejaculação.

Técnicas e parâmetros de avaliação do sêmen ovino

Avaliação de sêmen por técnica básica

A avaliação do ejaculado pode ser efetuada por manipulações rápidas e práticas, as quais possibilitam o emprego de equipamentos simples, que detectam com eficácia a real qualidade das amostras de sêmen (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998; HAFEZ, E.; HAFEZ, B., 2004). São avaliados os seguintes parâmetros: volume, aspecto, cor, odor, movimento de massa, motilidade progressiva individual, vigor, concentração e morfologia espermática.

Avaliação física

O volume é expresso em mililitros (mL) e a quantidade obtida está relacionada com o método de colheita, tempo de excitação e número de colheitas prévias. O volume médio é de 1,0 mL. O aspecto é avaliado visualmente e está diretamente relacionado com a baixa ou a alta concentração de espermatozoides presente no ejaculado. Sua variação compreende, respectivamente, do leitoso ao cremoso mármoreo. No ovino, o aspecto normal é do cremoso ao cremoso mármoreo. A coloração do ejaculado normal é pérola e odor ausente.

Avaliação de movimento de massa, motilidade individual e vigor

O movimento de massa é uma avaliação do movimento em ondas das células espermáticas na amostra de sêmen. Ele pode ser observado na borda de uma alíquota do ejaculado sobre lâmina aquecida a 37°C, sob um aumento de **10X** no microscópio ótico binocular. A interpretação é subjetiva e expressa em valores compreendidos entre zero a cinco, e a média é três. Zero é a ausência e cinco é o valor máximo atribuído a um acentuado movimento de ondas, comum em ovinos.

A motilidade progressiva individual é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides que atravessam o campo da amostra avaliada. O vigor representa a velocidade de propulsão do movimento espermático. A interpretação é subjetiva e expressa em valores compreendidos entre zero a cinco, onde zero é a ausência de movimento e cinco é o valor máximo atribuído a um movimento vigoroso e veloz. Para a avaliação destes dois parâmetros é necessária a diluição prévia de uma amostra do ejaculado com uma solução de citrato de sódio a 2,94%. Depois disso, coloca-se uma alíquota diluída entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e observa-se sob um aumento de **10X** no microscópio ótico binocular. A motilidade progressiva individual média descrita em ejaculados ovinos é de 75% e vigor três.

Os parâmetros da qualidade seminal que desclassificam um reprodutor ovino são: motilidade progressiva inferior a 70%, vigor menor que 3,0 e uma porcentagem superior a 20% de espermatozoides morfológicamente anormais.

Concentração espermática

A concentração representa o número de espermatozoides por mililitro (mm^3). O procedimento mais comum para se obter a concen-

tração espermática consiste na contagem das células na câmara de Neubauer. Existem dois outros métodos, a espectrofotometria e o *Micro-cell-counter*. O resultado da concentração espermática pode ser influenciado por fatores extrínsecos, como o método de colheita do ejaculado, a frequência de atividade do reprodutor e seu condicionamento e fatores intrínsecos como a idade, tamanho e estado de higidez testicular.

Câmara de Neubauer

O fator de diluição do ejaculado deve ser em função do aspecto do mesmo (leitoso, cremoso fino e cremoso marmóreo), o qual caracteriza menor ou maior concentração de células espermáticas. Desta forma, a diluição pode ser **1:200** para amostras de sêmen com aspecto leitoso e cremoso fino e **1:400**, no caso de amostras com aspecto cremoso marmóreo. A diluição do sêmen pode ser processada em solução fisiológica. Depois, realiza-se a homogeneização da amostra diluída antes de ser colhida a alíquota para o preenchimento da câmara com o auxílio de um tubo capilar. O líquido é depositado sob a lamínula até completar toda a superfície de um lado a outro, nos dois lados da câmara. A gota se espalhará entre a câmara e a lamínula por ação da capilaridade.

Após o preenchimento, a câmara deve permanecer em repouso na posição horizontal por cinco minutos para que as células fiquem sedimentadas no fundo da mesma. Para a contagem utiliza-se um microscópio ótico comum binocular, focando-se primeiro na objetiva 10X para a visualização de toda a extensão de um dos quadrantes da câmara e, depois, a contagem é feita na objetiva 40X. São contados cinco quadrados grandes, compostos de 16 quadrados pequenos, ou seja, sobre um total de 10/25 mm² de área em cada lado da câmara, totalizando dez quadrados maiores. Uma diferença na contagem superior a 10% entre os dois quadrantes pode indicar procedimento inadequado no preenchimento ou homogeneização. São consideradas apenas as cabeças dos espermatozoides. O cálculo da concentração espermática final é pela multiplicação do número total de espermatozoides contados nos 80 quadrados menores (T) por 10⁷ e obtém-se o número de células por mL (C) – **T x 10.000.000 = C (SPTZ / mL)**.

Espectrofotômetro

A espectrofotometria fundamenta-se no emprego de fotocolorímetro, aparelho que permite comparar a radiação absorvida ou trans-

mitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto e uma quantidade conhecida da mesma substância. No caso do ejaculado, este equipamento permite medir a quantidade de um feixe luminoso que passa por um volume padronizado de sêmen diluído em uma proporção estabelecida. No caso do ovino, é realizado em absorbância, isto é, quando a luz atravessa uma substância, parte da energia é absorvida: a energia radiante não pode produzir nenhum efeito sem ser absorvida. O aparelho é calibrado frente a uma amostra de sêmen diluída, de concentração conhecida através de determinação prévia por contagem direta. Diluição do sêmen ovino: **20 µl de sêmen + 8 mL de solução fisiológica.**

Micro-cell-counter

Este aparelho é de concepção eletrônica e procede a contagem baseada nas dimensões da célula e a leitura é rápida e confiável. Entretanto, trata-se de sistema sofisticado e custo elevado, não sendo usual na maioria dos laboratórios e centrais especializadas em reprodução animal.

Avaliação de sêmen auxiliada por computador

A cinética espermática é considerada uma das características mais importantes associadas com a habilidade de fertilização do espermatozoide. Ela é a expressão da viabilidade e integridade estrutural dessa célula. A análise da qualidade do sêmen é usualmente realizada pela avaliação subjetiva da motilidade individual, e isso tem reduzido a acurácia deste exame devido à alta variabilidade observada entre avaliadores, em torno de 30 a 60%. Desta forma, atualmente tem sido utilizado um método de avaliação objetiva com o auxílio da Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA) nos seguintes parâmetros: motilidade, morfologia e morfometria e diferentes sub-populações de espermatozoides em uma amostra (ANEL et al., 2006).

O sistema CASA é definido como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, emitindo informação precisa e significativa do movimento individual de cada um e, também, resumos estatísticos da população espermática. Este permite a detecção de súbitas mudanças na cinética espermática e maior acurácia nas pesquisas com novos meios extensores. Os parâmetros comumente obtidos através de analisadores de sêmen computadorizados são: velocidade do percurso curvilíneo

(VCL); velocidade do percurso médio (VAP); velocidade em linha reta (VSL); retilinearidade (STR); linearidade (LIN); oscilação (WOB); frequência de batimento cruzado (BCF); e deslocamento lateral da cabeça (ALH) (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

Existe a possibilidade de erros potenciais nas mensurações realizadas neste sistema, como a dificuldade na distinção entre espermatozoides e *debris* (células não espermáticas), levando a uma superestimação da sua concentração e subestimação na proporção de espermatozoides móveis. A presença de espermatozoides aglutinados também afeta a correta avaliação da concentração espermática e de percentual de espermatozoides móveis. Concentração elevada de espermatozoides na amostra analisada interfere na reconstrução da trajetória dos espermatozoides analisados, podendo haver sobreposição de trajetórias distintas de modo que sejam interpretadas como uma só (MORTIMER, 1997).

O sistema CASA possibilita a análise da morfologia e morfometria dos espermatozoides, indicando possíveis alterações reprodutivas e de animais sub-férteis, quando houver ocorrência anormal nestas características. Permite distinguir diferentes sub-populações de espermatozoides em uma amostra, influenciando nas mesmas a susceptibilidade para a capacitação e a habilidade de fertilização. Incrementa o teste laboratorial no emprego de novos meios extensores (AMANN; KATZ, 2004; NÚÑEZ-MARTINEZ et al., 2007).

Avaliação da morfologia e membranas espermáticas

Tradicionalmente, a avaliação das características morfológicas dos espermatozoides é realizada através de preparação úmida ou esfregaços corados. Atualmente, a célula espermática é classificada como possuindo defeitos maiores ou menores, caracterizados pela gravidade dos seus efeitos deletérios à fertilidade. Na espécie ovina a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais tem correlação direta com a fertilidade. A integridade da membrana espermática é um atributo essencial para a fertilidade da célula. Desta forma, a análise deste parâmetro é fundamental para a predição da real fertilidade do animal. Muitos estudos têm sugerido que existem alguns aspectos da criopreservação que acarretam uma maturação excessiva na membrana espermática e, conseqüentemente, leva ao

aumento do número de espermatozoides capacitados e acrossoma reagidos (HOLT, 2000; LUZ et al., 2000; NÖTHLING; IRONS, 2008).

Preparação úmida

A primeira etapa é o preparo de uma solução formol – salina tamponada, previamente aquecida a 37°C. Para cada amostra de sêmen, deve ser adicionado em 1 mL desta solução, alíquotas de sêmen necessárias até a obtenção de um aspecto leitoso. Estas amostras devem ser preservadas sob refrigeração a 5°C. É aconselhável a ressuspensão periódica das células através de agitação moderada até o momento do exame, reduzindo-se, assim, a ocorrência de aglutinação espermática. A montagem da preparação úmida consiste na colocação de uma gota desta solução leitosa sobre lâmina limpa e estéril, cobrindo-a de imediato com uma lamínula. O excesso do líquido pode ser absorvido por uma gaze pressionada suavemente sobre este conjunto. A lamínula pode ser fixada sobre a lâmina por meio de esmalte cosmético aplicado sobre as bordas. A leitura é realizada em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial com aumento de 1.000X e devem ser contadas 200 células espermáticas (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1988).

Colorações vitais

Em seguida à obtenção do sêmen, devem ser preparados de dois a três esfregaços finos em lâminas estéreis e previamente aquecidas a 37°C. A alíquota de sêmen deve ser estirada (puxada) da parte posterior da lâmina elevada obliquamente em um ângulo de 45° em direção à parte que vai receber o esfregaço. Este procedimento evita lesões grosseiras, como o desprendimento de cabeça e fraturas nas peças intermediárias ou principais. Após a secagem dos esfregaços, realiza-se a coloração escolhida e a avaliação da morfologia deve ser em microscópio ótico comum em aumento de 400X e são contadas 200 células espermáticas (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1988).

O uso de corantes vitais é importante para a determinação de espermatozoides com danos na membrana da cabeça, sendo que estes não podem passar pela membrana íntegra de uma célula viva, mas penetram em células mortas, corando-as. Para atender à finalidade de identificação de espermatozoides vivos e mortos, podem ser utilizadas as seguintes colorações: os corantes à base de Eosina-Nigrosina

e Azul de Tripán são colorações supravitais usadas para identificação de espermatozoides viáveis; já os mortos, em função dos danos na membrana da cabeça, permitem a penetração destes corantes e os vivos com membrana íntegra não. A integridade do acrossoma é pré-requisito básico para definir o potencial de fertilidade dos espermatozoides, sendo que a porcentagem dos que apresentam reação acrossômica possui correlação negativa com a fertilidade. Entretanto, a integridade acrossomal não reflete necessariamente na integridade de membrana plasmática, sendo importante o uso de testes que combinem as duas avaliações (GONZALEZ, 1996; BRISOLA et al., 1999; GIL et al., 2003; CAVALCANTE, 2008; FRANCO et al., 2010). O corante à base de Azul Tripán, Marrom de Bismarck e Rosa Bengala (TALBOT; CHACON, 1991) e o à base de Azul Tripán, Neutral Red e Giemsa (KOVÁCS; FOOTE, 1992 - Figura 7-3) são colorações que permitem simultaneamente a identificação da integridade ou não de membrana do acrossoma e a viabilidade espermática, apresentando os espermatozoides mortos corados e os vivos não. Estas colorações estabelecem as seguintes categorias de classificação do espermatozoide:

1. espermatozoide vivo com acrossoma íntegro
2. espermatozoide vivo com acrossoma lesado
3. espermatozoide morto com acrossoma íntegro
4. espermatozoide morto com acrossoma lesado

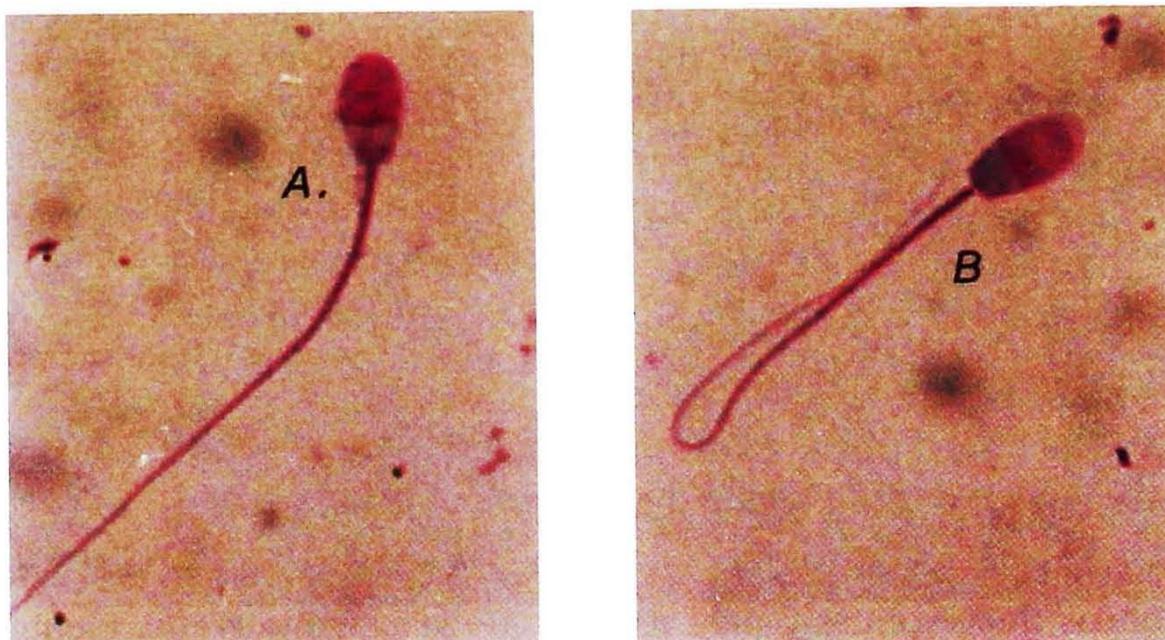


FIGURA 7-3. Morfologia do acrossoma e viabilidade espermática no sêmen ovino descongelado. Fonte: Gonzalez (2009). A - Célula viva com acrossoma íntegro. B - Célula viva com acrossoma edemaciado

COLORAÇÃO KOVÁCS; FOOTE (1992) – Composição e modo de preparo:**Corante Azul Tripan**

Solução de Cloreto de Sódio 0,81%

Azul Tripan 0,25 g

Água destilada 100 mL

Fixador

Ácido clorídrico (1N) 86 mL

Formaldeído (37%) 14 mL

Neutral Red 0,2 g

Solução Giemsa (7,5%)

Giemsa 1,0 g

Glicerina 54 mL

Preparo da solução: Dissolver estes dois compostos à temperatura de 60°C durante duas horas, deixar esfriar em temperatura ambiente e adicionar 84 mL de metanol. Amadurecer em frasco âmbar por uma semana e depois filtrar. Conservar entre 4°C a 5°C.

Confeção dos esfregaços: Os esfregaços devem ser confeccionados através da deposição de 10 µl de sêmen e 10 µl da solução de Azul Tripan próximos à extremidade da lâmina e, em seguida, as duas amostras devem ser homogenizadas. Depois disso, as lâminas devem ser mantidas em posição vertical até apresentarem-se completamente secas, momento em que devem ser imersas na solução fixadora de formaldeído e Neutral Red por cinco minutos, seguindo-se a lavagem das lâminas em água destilada. Após este procedimento, as lâminas devem ser colocadas em cubetas plásticas com divisórias contendo a solução de Giemsa por um período de quatro horas. Transcorrido este período, as lâminas devem ser novamente lavadas em água destilada e mantidas em temperatura ambiente até apresentarem-se completamente secas. Devem ser contadas 200 células em microscopia de contraste de fase sob imersão.

Avaliação da integridade da membrana plasmática

A avaliação da integridade da membrana plasmática por meio de sondas fluorescentes é uma técnica que vem sendo regularmente adotada nas centrais, laboratórios e instituições de pesquisa com o objetivo de se obter acurácia dos efeitos ocasionados pelo emprego de novos meios diluidores e técnicas utilizadas para a criopreservação de sêmen em ovinos (MEDINA, 1995; GONZALEZ, 1996;

BRISOLA et al., 1999; TONIETO, 2008; CARVALHO et al., 2008; MOURA et al. 2010). A técnica original consiste na combinação de corantes biológicos à base de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP) (HARRISON; VICKERS, 1990 - Figura 7-4). Esta coloração estabelece as seguintes categorias de classificação da condição do espermatozoide e sua membrana plasmática:

Categoria 1 – Acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha): células espermáticas com membranas plasmáticas íntegras.

Categoria 2 – Acúmulo de DIC (fluorescência verde) na peça intermediária e acúmulo de IP (fluorescência vermelha) somente na cabeça: células espermáticas com membrana plasmática danificada e acrossomal íntegra e membranas mitocondriais intactas.

Categoria 3 – Acúmulo de IP (fluorescência vermelha) na cabeça e peça intermediária sem acúmulo de DIC (fluorescência verde): membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais danificadas.

Categoria 4 – Acúmulo de uma coloração amarelada fluorescente na região acrossomal e acúmulo de IP (fluorescência verme-

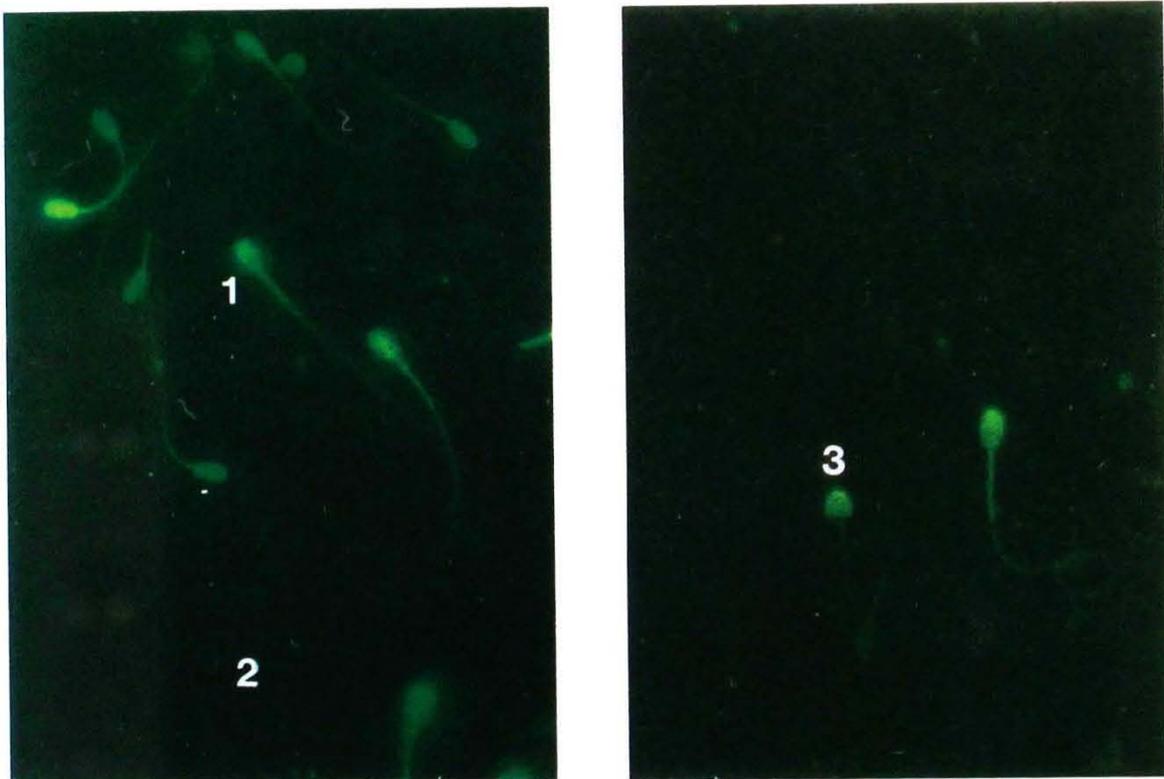


FIGURA 7-4. Coloração simultânea com DIC e IP. Fonte: Gonzalez (2009).

1. Espermatozoide com as membranas íntegras. 2. Espermatozoide com as membranas danificadas. 3. Espermatozoide com as membranas acrossomática e mitocondrial íntegras e plasmática lesada.

lha) na cabeça e acúmulo de DIC (fluorescência verde) na peça intermediária: esta categoria sugere que a célula espermática pode estar em processo de apoptose.

A leitura é feita em microscópio de epifluorescência, através de excitação em filtro WU, sob aumento de 400x e contadas 200 células espermáticas em uma mesma lâmina.

COLORAÇÃO HARRISON; VICKERS (1990) – Composição e modo de preparo:

Preparo da solução estoque salina isotônica

Cloreto de sódio 0,8183 g/100 mL

Glicose 0,1799 g/100 mL

Cloreto de potássio 0,0186 g/100 mL

Álcool polivinílico 0,0500 g/100 mL

Polivinilpirrolidona 0,0500 g/100 mL

Hepes (Cód. 3375) 0,2383 g/100 mL

Hepes (Cód. 7006) - sal de sódio 0,2603 g/100 mL

O pH deve ser ajustado para 7,5 e a solução pode ser estocada a 4°C por seis meses.

Preparo da solução de formaldeído

Formaldeído a 37% 1 mL

Água destilada 148 mL

Esta solução deve ser preparada imediatamente antes do uso.

Preparo da solução estoque de iodeto de propídio

Iodeto de propídio 0,0005 g

Solução salina isotônica 1 mL

Preparo da solução estoque de diacetato de carboxifluoresceína

Diacetato de carboxifluoresceína 0,0005 g

Dimetilsulfóxido 1 mL

Estas duas últimas soluções devem ser estocadas a -20°C, em local escuro por tempo indeterminado.

Confecção dos esfregaços: Após a descongelação de uma amostra de sêmen, esta deve ser diluída em 3 mL da solução salina e submetida à centrifugação em 600 g durante 10 minutos. Depois disso, o sobrenadante deve ser desprezado e o sedimento ressuspensionado em 3 mL da solução salina. Para o procedimento da coloração das células espermáticas uma alíquota de 20 µl deve ser retirada da suspensão final e adicionada 40 µl do meio de coloração e a amostra final será mantida em banho-maria à 37°C durante oito minutos.

A avaliação quantitativa de células com membranas espermáticas íntegras e alteradas será determinada mediante a contagem de 200 células por leitura de lâmina sob microscopia ótica de contraste de fase e iluminação epifluorescente.

Confecção e implicação dos extensores

Introdução

A composição dos meios extensores constitui um dos principais critérios a ser estudado para a eficácia nos procedimentos criobiológicos do sêmen nos animais domésticos. Nos ovinos, este fato afeta severamente a proporção de espermatozoides viáveis após a descongelação. A confecção do meio diluidor quanto à adição de substâncias nutritivas, energéticas e crioprotetoras está em detrimento das características seminais de cada espécie e, também, em função das peculiaridades existentes na composição e sensibilidade das membranas espermáticas quando expostas ao frio extremo (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Desta forma, são necessárias modificações na manipulação dos diluidores para o ajuste das particularidades presentes em cada espécie. Um diluente deve reunir as seguintes características: apresentar substrato como fontes de energia e de nutrientes; manter a pressão osmótica adequada funcionando como um meio tampão; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado; e proteger as células espermáticas durante a exposição ao frio extremo no momento da criopreservação (HAFEZ, E. ; HAFEZ, B. 2004).

Compostos diversos e suas funções

Atualmente, a criopreservação na espécie ovina encontra-se em expansão de aplicabilidade e muitos estudos têm sido conduzidos visando contornar problemas relacionados à manipulação do sêmen, congelabilidade das células espermáticas e aumento da população de espermatozoides viáveis recuperados após a sua descongelação (ANEL et al., 2006).

Os meios diluidores destinados à congelação de sêmen devem conter substâncias orgânicas que atuem como crioprotetores externos e internos. Os crioprotetores com função externa preservam os espermatozoides contra o choque térmico produzido durante o resfriamento do ejaculado, a partir de 20°C até os 5°C. As substâncias

mais comumente utilizadas são a gema de ovo e o leite desnatado. A fração ativa da gema de ovo é uma lipoproteína de baixa densidade (LDL), a fosfatidilcolina (lecitina), um componente de alto peso molecular com ação restrita ao nível da superfície celular, sendo um dos agentes mais efetivos na proteção contra o choque térmico. Previne o enrolamento das caudas e protege a motilidade individual das células espermáticas. Esta atividade protetora pode ser otimizada pela adição de detergentes sintéticos ao meio, que promoveriam uma emulsificação destes lipídeos e ocasionariam maior interação com a membrana plasmática do espermatozoide. É sugerido que a LDL tem capacidade de agregar-se à membrana plasmática durante o processo de congelação, evitando a perda de seus fosfolipídeos e aumentando a tolerância ao processo de criopreservação. A gema liofilizada pode ser utilizada e pasteurizada, evitando-se uma possível contaminação microbiológica com a gema fresca de origem animal. No caso do leite desnatado, a sua fração ativa é a caseína, proteína que atua como tampão de solução contra as trocas de pH e confere proteção durante o processo de resfriamento do espermatozoide (GRAHAM, 1971; PURSEL et al., 1978; SANCHÉZ-PARTIDA, 1992; GONZALEZ, 1996; EL-ALAMY; FOOTE, 2001; MAIA et al., 2005).

A sensibilidade dos espermatozoides às mudanças de temperatura se deve à ação protetora do plasma seminal. Desta forma, as proteínas do plasma seminal secretadas na vesícula seminal, identificadas como RSVPI4 e RSVP20, são citadas como capazes de proteger os espermatozoides ovinos expostos à queda de temperatura e tem atuação na estabilização da sua membrana plasmática, evitando o evento de capacitação (MCDONALD ; PINEDA, 1991; PÉREZ-PÉ et al., 2001; BARRIOS et al. 2005; FERNANDEZ-JUAN et al., 2006).

Em bovinos, as proteínas do plasma seminal (BSP) ligam-se à membrana plasmática dos espermatozoides, induzindo o efluxo de colesterol e fosfolipídeos, acarretando a sua desestabilização. Nesta espécie, é proposto que a LDL da gema do ovo e a caseína do leite presentes nos meios diluidores sequestram a maioria das BSP, evitando a ligação das mesmas ao espermatozoide, resultando em mínima modificação da membrana plasmática durante as fases do processo criobiológico, permitindo sua melhor conservação. Proteínas semelhantes à BSP têm sido encontradas em ovinos, e é sugerido que os mecanismos de proteção podem ser similares aos observados em bovinos (MANJUNATH et al., 2002; JOBIM et al., 2005; BERGERON et al., 2007).

Os crioprotetores são classificados dependendo de seu poder de penetração na membrana plasmática, em intracelulares – constituídos de moléculas pequenas, exigindo o seu uso em maiores concentrações – e extracelulares – constituídos de moléculas grandes e requerem menor concentração – para a finalidade de proteção espermática contra os malefícios provocados pela criopreservação. Na espécie ovina, o glicerol é o principal crioprotetor utilizado com função intracelular. Entretanto, a sobrevivência espermática é altamente afetada (pode ser em torno de 60% a 70%) durante a congelação. Deste modo, a sua adição em etapas parece representar o melhor equilíbrio entre a citotoxicidade e a crioproteção. Outras substâncias de ação interna como o etilenoglicol, o DMSO (dimetilsulfóxido) e o propanodiol têm sido testadas, mas apresentam resultados inferiores em comparação aos obtidos com o glicerol. Os extracelulares mais utilizados são os açúcares como a sacarose, a rafinose e a trealose, proteínas e lipoproteínas contidas no leite e na gema de ovo (MERYMAN et al., 1977; SALAMON; MAXWELL, 1995; 2000; ANEL et al., 2003).

A trealose é um dissacarídeo não penetrante e possui ação específica na interação com os fosfolipídeos da membrana plasmática, com proteção na manutenção da sua estabilidade e das proteínas celulares. Atua na desidratação celular, reduzindo a formação de cristais de gelo e acarretando, por consequência, a diminuição das crioinjúrias das organelas celulares, em função dos procedimentos criobiológicos, e proporcionando maior flexibilidade à membrana espermática. É citado que esse composto confere ao diluente a característica de hipertonidade e desempenha papel de um antioxidante, protegendo a membrana contra o ataque de radicais livres e ocasionando maiores taxas de espermatozoides viáveis após a descongelação (ABOAGLA; TERADA, 2003; AISEN et al., 2005; VALLERIOTE et al., 2005; BERLINGUER et al., 2007; SARIÖZKAN et al., 2010).

As fontes de energia mais usualmente empregadas são os monossacarídeos, como a frutose e a glicose. Como componentes com propriedade tampão, o TRIS (hidroximetil aminometano) e o citrato de sódio são adicionados aos extensores. Para prevenção do crescimento bacteriano, utilizam-se os antibióticos, como a penicilina, estreptomomicina ou gentamicina (EVANS; MAXWELL, 1990; SALAMON; MAXWELL, 2000).

O uso de aditivos aos meios extensores tem por finalidade a sua interação com os demais componentes do meio, incrementando a preservação da célula espermática. O *Orvus es Paste* (Equex-STM) é

um detergente sintético com propriedades solubilizantes. Acredita-se que ele tenha a capacidade de alterar os constituintes da gema de ovo, conferindo ao metabolismo celular substâncias solúveis na fração lipídica compreendida em seu meio de suspensão. As concentrações utilizadas variam de 0,5% a 1,5% nos mais diversos meios diluidores e em diferentes espécies animais. Os aminoácidos, como a glicina betaína e a prolina, são citados como efetivos crioprotetores complementares do espermatozoide ovino (GRAHAM, 1971; PURSEL et al., 1978; SANCHEZ-PARTIDA, 1992; GONZALEZ, 1996; EL-ALAMY; FOOTE, 2001; MAIA et al., 2005).

A seguir estão descritas três formulações de compostos de meios diluidores recomendados para a congelamento de sêmen ovino:

1. GLICINA - GEMA

Solução A Solução B

Glicina natural 1,40 g Frutose 3,0 g
 Citrato de sódio 2,97 g Glicose 3,0 g
 Água destilada 100 mL Água destilada 100 mL
 Penicilina 0,033 g Penicilina 0,033 g
 Dihidroestreptomicina 0,1 g Dihidroestreptomicina 0,1 g

Meio I Meio II

Solução A +B 70,00 mL Solução A +B 65,00 mL
 Gema de ovo 20,00 mL Gema de ovo 20,00 mL
Orvus es paste 0,40 mL *Orvus es paste* 0,40 mL
 Água destilada 9,60 mL Glicerol 10,00 mL
 Água destilada 4,60 mL

2. GLICINA - GEMA - LEITE

Solução A Solução B

Glicina natural 1,40 g Frutose 3,0 g
 Citrato de sódio 2,97 g Água destilada 100 mL
 Água destilada 100 mL Penicilina 0,033 g
 Penicilina 0,033g Dihidroestreptomicina 0,1g
 Dihidroestreptomicina 0,1 g

Meio I Meio II

Solução A +B 60,00 mL Solução A +B 54,00 mL
 Gema de ovo 20,00 mL Gema de ovo 20,00 mL
Orvus es paste 0,40 mL *Orvus es paste* 0,40 mL
 Leite desnatado (11%) 15,00 mL
 Leite desnatado (11%) 15,00 mL
 Água destilada 4,60 mL Glicerol 10,00 mL
 Água destilada 4,60 mL

- Observações no preparo das soluções **A** e **B** nos dois meios descritos acima: Aquecer as duas soluções separadamente até a temperatura de 94°C; depois baixar a chama do fogo até o mínimo e manter nesta condição por 15 minutos. Em seguida, deixar esfriar em temperatura ambiente. Depois misturar as duas soluções (A + B) e adicionar os antibióticos recomendados.

A adição do detergente *Orvus es paste* na solução dos meios I e II deve ser antes da colocação da gema de ovo.

3. TRIS (hidroximetil aminometano) **Aditivado**

Meio I Meio II

Tris 3,786 g Tris 3,786 g

Frutose 1,0 g Frutose 1,0 g

Ácido cítrico 2,11 g Ácido cítrico 2,11 g

Gema de ovo 20 mL Gema de ovo 20 mL

Orvus es paste 0,40 mL *Orvus es paste* 0,40 mL

Gentamicina 40 mg Glicerol 10,0 mL

Água destilada 100 mL Gentamicina 40 mg

Água destilada 100 mL

A adição do detergente *Orvus es paste* na solução dos meios I e II deve ser antes da colocação da gema de ovo.

Membranas espermáticas

Sob condições fisiológicas, a forma das membranas biológicas foi delineada como sendo uma estrutura em mosaico fluido. Esta seria constituída por uma dupla camada, não apresentando contorno contínuo em virtude de ser interrompida por diversas proteínas que se intercalam em graus diferentes no interior da membrana. Ao longo de sua maior fração, compostos como os lipídeos, glicolipídeos, proteínas e glicolipídeos seriam organizados de maneira assimétrica em relação à distribuição de moléculas específicas nas faces interna e externa. Em relação às proteínas e glicoproteínas compreendidas na membrana celular, estas seriam dispostas de forma heterogênea e poderia ocorrer divisão funcional em duas classes distintas: integrais ou intrínsecas e periféricas ou extrínsecas (SINGER; NICOLSON, 1972).

Durante as etapas do processo criopreservativo ocorrem alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais em boa parte das células espermáticas, resultando em baixas taxas de espermatozoides com motilidade individual e morfologicamente viáveis após a des-

congelção. As mudanças ultraestruturais afetam, principalmente, a membrana plasmática, pois durante os processos de congelção e descongelção ocorre uma desorganização dos lipídeos, o que altera as interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína da membrana espermática. Esta redistribuição de lipídeos ocorre na fase de resfriamento entre as temperaturas iniciais de 30°C para a temperatura de 5°C (HOLT; NORTH, 1984 ; 1986).

Em adição aos efeitos estruturais na membrana plasmática, incluindo a dos espermatozoides, um alto grau de insaturação do volume dos compostos fosfolipídicos hidrocarbonados – adição do crioprotetor, associada aos atos de distensão e contração em resposta a soluções hiperosmóticas, da desidratação induzida pela congelção, elevada concentração de solutos, da formação de gelo intracelular, formação de processos oxidativos e liberação de radicais livres – somatizam a probabilidade da ocorrência de injúrias na célula espermática (PARKS; GRAHAM, 1992).

Técnicas para congelção de sêmen

Diluição e período de equilíbrio

A diluição e o período de equilíbrio podem ser realizados das seguintes maneiras: o ejaculado é diluído a 30°C na porção do diluente sem glicerol (meio I), submetido a um período de equilíbrio a temperatura de 5°C durante 1,5 a 2,0 horas e adiciona-se a porção do diluente com glicerol (meio II); o ejaculado é diluído a 30°C na porção do diluente sem glicerol (meio I) e na porção com o glicerol (meio II) sob homogenização lenta e depois é submetido a um período de equilíbrio de 90 minutos na mesma temperatura do primeiro método; o ejaculado é diluído na porção do extensor sem o glicerol (fração A) a 32°C, submetido a um período de equilíbrio na temperatura de 4°C durante 120 minutos e, após este período, a porção do meio com o glicerol (fração B) é adicionada em três etapas a intervalos de cinco minutos (EVANS; MAXWELL, 1990; GONZALEZ, 1996; CAVALCANTE, 2008).

Para o resfriamento as palhetas, as mesmas são dispostas em posição horizontal sobre grades metálicas e podem ser colocadas dentro de invólucros plásticos insuflados com ar. Estes permanecem fechados durante os 30 minutos iniciais e depois são abertos e permanecem dessa forma até o final do tempo de resfriamento estabelecido.

As diluições devem ser processadas para que a concentração final por dose tenha de 100 a 150 X 10⁶ ou 40 a 50 X 10⁶ espermatozoides viáveis, respectivamente, para o uso em inseminação artificial cervical superficial ou profunda e deposição intrauterina por laparoscopia. O envase usual é feito em palhetas do tipo francês, de 0,5 mL, e o lacre pode ser feito com o alicate selador. Recomenda-se deixar uma bolha de ar na coluna central da palheta, evitando, assim, o estouro da mesma durante o procedimento criobiológico (GONZALEZ, 1996).

Métodos de congelação

O sêmen pode ser congelado em caixa de isopor adaptada para esta finalidade e o procedimento ocorre de forma horizontal. Transcorrido o término do período de equilíbrio estabelecido, as palhetas são dispostas horizontalmente sobre um gradil e mantidas a 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido (camada de vapor), referente a temperatura entre -79°C a -80°C, onde permanecem por 20 minutos, quando então são imersas a uma temperatura de -196°C, acondicionadas em raques metálicas dentro dos canisters e armazenadas em botijões criogênicos. Em centrais de alta produção de sêmen manipulado para fins comerciais, interno e externo ou formação de grandes bancos de germoplasma do gameta masculino, a criopreservação do sêmen é usualmente executada de forma vertical em máquina de congelação – Cryogen®.

Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a congelação

O resfriamento é a etapa inicial do procedimento criobiológico. Durante esse processo ocorre a mudança de fase dos colesteróis de membrana, que passam da fase líquida para a gel. Esta etapa pode acarretar danos estruturais ao espermatozoide pelo fenômeno denominado choque-frio. A célula espermática ovina sofre as seguintes alterações microestruturais causadas pelo choque-frio: redução a níveis perto de zero da atividade respiratória; a frutólise e a glicólise anaeróbica; liberação de proteínas intracelulares como o citocromo c; perda de lipídeos, predominantemente os fosfolipídeos, sugerindo a ocorrência de fragmentação de membrana do acrossoma e plasmática; alterações no metabolismo de carboidratos; liberação de enzimas intracelulares, a exemplo da lactato-desidrogenase, transaminases, fosfatase alcalina e ácida, glicose-6-fosfatodesidrogenase e glicose

fosfato isomerase; alteração na distribuição de cátions; e liberação de fosfoglicerídeos de colina (SALAMON; MAXWELL, 1995).

A susceptibilidade à mudança de temperatura se inicia durante o trânsito do espermatozoide pelo epidídimo. Com o choque-frio ocorrem distúrbios catiônicos no interior da célula, o sódio e cálcio são aumentados e o potássio e magnésio são perdidos. Como o movimento destes acontece por difusão passiva, o acúmulo de cálcio, após o choque-frio, torna-se contrário ao gradiente de concentração. Isto sugere que a permeabilidade da membrana é alterada, o cálcio é carregado para o interior da célula na forma conjugada. Os seus sítios de ligação são identificados na membrana do acrossoma e estão envolvidos com a reação acrossomática cálcio-dependente (WATSON, 1981).

A membrana plasmática é composta de três classes lipídicas principais, os glicolípídeos, os fosfolípídeos e o colesterol. A sua fluidez está na dependência da temperatura, teor e grau de saturação do colesterol; colesterol saturados garantem rigidez e os insaturados conferem maior fluidez e desorganização à membrana (PARKS; GRAHAM, 1992).

A criopreservação induz à capacitação espermática prematura, em parte ocasionada pelas ligações de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, o que pode produzir uma população de espermatozoides não viáveis após a descongelação (AISEN et al., 2005).

Avaliação de sêmen descongelado

A avaliação inicial da viabilidade do espermatozoide é feita no momento da descongelação das amostras (momento zero). Para isto, o conteúdo de uma palheta é descongelado a 37 °C por 30 segundos, sendo suspenso em 1 mL de meio tampão, previamente aquecido nesta temperatura em um tubo de ensaio. A qualidade da amostra descongelada pode ser realizada pelo teste de termoresistência lento (TTL) durante três horas nesta temperatura em banho-maria. O sêmen será considerado apto se apresentar no mínimo 30% de espermatozoides com motilidade progressiva individual, vigor 3 e a porcentagem de defeitos morfológicos totais inferior a 20%.



NUTRIÇÃO

Fatores nutricionais associados à reprodução

8



Os fatores nutricionais envolvem estratégias de manejo que propiciam aumento na eficiência reprodutiva.

Efeito do *flushing* na reprodução

O *flushing* é utilizado para melhorar a condição nutricional dos reprodutores em períodos curtos de uso, antes do início da atividade sexual, e tem a finalidade promover o desenvolvimento de folículos ovarianos e potencializar a resposta da taxa ovulatória na ovelha. O aumento da ovulação espontânea ou induzida pela aplicação de hormônios em rebanhos destinados à monta natural ou submetidos à sincronização artificial de estro aumenta a taxa de fertilidade do rebanho (SORMUNEN-CRISTIAN; JAUHAINEN, 2001 ; 2002; GONZALEZ, 2009).

Ovelhas submetidas ao sistema de *flushing* no período do pré-acasalamento, respondem com aumento na sua potencialidade reprodutiva, expressa no maior número de fêmeas concebidas e na maior taxa de prolificidade, gerando, pelo aumento no número de partos múltiplos, maior número de cordeiros para programas reprodutivos e de melhoramento. Esse manejo inicia-se 30 dias antes da estação sexual e exige o acompanhamento nutricional da ovelha durante a gestação, o que favorecerá o maior peso ao nascer e menor taxa de mortalidade perinatal da(s) cria(s) e, por consequência, maior índice de cordeiros desmamados (CHIBA, 2009).

A avaliação do escore corporal é uma alternativa eficiente para otimizar o manejo a fim de aferir o *status* nutricional dos reprodutores durante a estação reprodutiva. No pré-acasalamento, a avaliação das ovelhas e classificação em grupos divididos pelo escore corporal permite desenvolver estratégias nutricionais específicas, no intuito que todas as fêmeas cheguem em condições satisfatórias à estação reprodutiva. Outras ações complementares a serem incorporadas aos programas de reprodução compreendem aferir o peso regularmente, utilizar o método Famacha para determinar o grau de anemia das ovelhas provocadas pela verminose e coletar fezes para o conhecimento da quantidade de ovos por grama de fezes (OPG). Os animais, reprodutores e matrizes, com OPG acima de 4.000 são tratados com endectocidas.

A avaliação do escore corporal representa ferramenta importante a ser aplicada no rebanho, varia entre grupos raciais e é maior

em ovelhas mais velhas, influenciando positivamente no peso de cordeiros nascidos e nas fêmeas de maior porte. O escore corporal é classificado como 3, sendo este mensurado pela avaliação da espessura de gordura que cobre os processos dorsais e os transversais, conforme preconizado por Russel et al. (1969), ver a Figura 8-1. No Quadro 8-1, constam as características anatômicas que proporcionam o melhor desempenho sexual das fêmeas (GUNN et al., 1984; RIBEIRO et al., 2003; KENYON ; BLAIR, 2009). Ovelhas que ainda não tenham atingido esse escore corporal ideal no período reprodutivo podem ser concebidas desde que ganhando peso, mas exigem suplementação para que não sofram na lactação, o que diminui o desempenho na próxima estação sexual.

As estratégias nutricionais para os reprodutores vão desde um *flushing* em pastagens preparadas para recebê-los até o uso de suplementação.

Estratégias no emprego do *flushing*

Algumas estratégias de nutrição podem ser aplicadas pelo pastejo em pastagens de alto valor nutritivo, uso de forragem conservada, suplementação a campo e confinamento (CORNER ; KENYON,

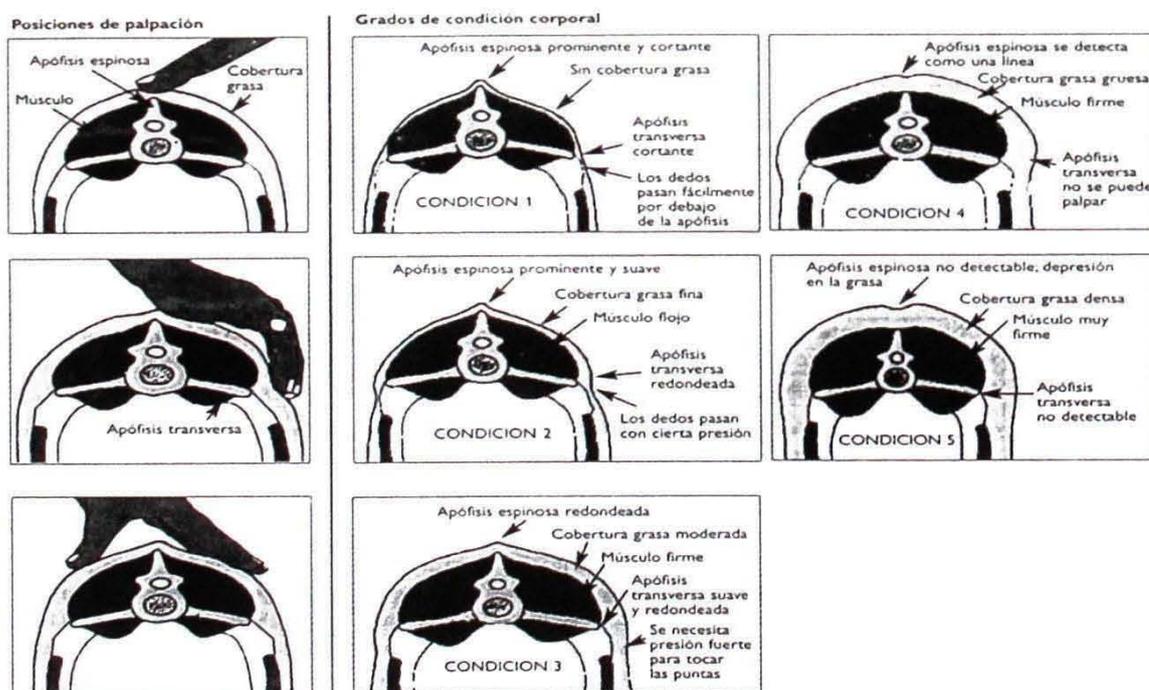


FIGURA 8-1. Posições de apalpação do escore corporal. Fonte: Russel, 1969.

QUADRO 8-1. Características anatômicas de cada condição corporal de ovinos

CONDIÇÃO CORPORAL	CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS OBSERVADAS
CC1	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Processo espinhoso agudo e proeminente ▶ Não há cobertura de gordura ▶ As apófises transversas são agudas e seus extremos são palpáveis
CC2	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Processo espinhoso agudo e proeminente ▶ Há cobertura muscular e pouca cobertura de gordura ▶ As apófises transversas estão suaves e levemente arredondadas, sendo possível ultrapassar suas extremidades sob pressão
CC3	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Os processos espinhosos estão suaves e arredondados e podem ser palpados apenas sob pressão ▶ As apófises transversas estão suaves e bem cobertas ▶ O preenchimento muscular é completo e pouca cobertura de gordura
CC4	<ul style="list-style-type: none"> ▶ O processo espinhoso pode ser detectado sob pressão como linha dura ▶ As apófises transversas não são palpáveis ▶ A cobertura muscular é completa e recoberta por gordura
CC5	<ul style="list-style-type: none"> ▶ O processo espinhoso não é palpável ▶ Ao longo da coluna existe uma depressão ▶ As apófises transversas não são detectadas ▶ A cobertura muscular é completa e recoberta de gordura

Fonte: Russel (1969)

2007; POLI et al., 2008). A disponibilidade de diversos tipos de alimentos para a aplicação de *flushing* é altamente benéfico, uma vez que o aporte energético e proteico impacta os custos da atividade produtiva, sendo preferível, sempre que possível, utilizar alternativas mais econômicas que também sejam eficazes.

O valor nutricional de uma pastagem somente pode ser medido em termos de produto animal, particularmente em condições de pastejo. Porém, a qualidade da dieta não depende somente do valor nutritivo da forragem, mas também da possibilidade e capacidade do animal em selecionar uma dieta rica em nutrientes. A disponibilidade de forragem de qualidade é um parâmetro central no manejo do pastejo e indica a oportunidade do animal selecionar sua dieta, sen-

do esta o fator determinante no desempenho produtivo e no sucesso da exploração. Dentre as espécies de ruminantes, os ovinos são um dos mais exigentes na qualidade do pasto. No entanto, eles possuem características que lhes permitem ser altamente seletivos durante o pastejo (POLI; CARVALHO, 2003; PEREIRA NETO, 2004).

A disponibilidade de pastos de alto valor nutritivo aumenta a ingestão de matéria seca, energia digestível, proteína bruta e carboidratos solúveis em água e de taninos condensados. O aumento nas concentrações de nitrogênio e tanino condensado aumenta também a proporção de proteína não degradada no rúmen, disponibilizando mais proteína no intestino, o que explicaria um aumento na eficiência reprodutiva de ovelhas. Entretanto, as forrageiras de climas tropicais mostram desempenhos menores devidos ao baixo valor nutritivo, sendo aconselhada a suplementação energética-proteica (McWILLIAM et al., 2004).

No caso de se optar por estratégia de baixo custo, a preferência é por manutenção das doadoras em pastagens de alto valor nutricional (Figura 8-2). O *flushing* será conduzido com oferta de forragem de 12% (12 kg forragem/100 kg de peso vivo do lote) ou superior. Pode ser utilizado o milheto, as gramas tifton e estrela africana, ou em condições tropicais, o *Panicum maximum* e a *Brachiaria brizantha*, desde que com alta oferta de folhas e com adubação de manutenção adequada, principalmente de nitrogênio.

O acesso à área de pastagem de maior valor nutricional composta por leguminosas, também chamada de legumineira, é outra opção. A área de acesso restrito pastagens pode ser formada por amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) e *Stylosanthes* spp., com acesso controlado duas vezes ao dia, por período aproximado de 2 horas ou alfafa (*Medicago sativa*), por período aproximado de 1 hora, medida necessária para evitar timpanismo.

Quando não for possível contar com pastagens em condições de uso para o *flushing*, o modo mais prático, porém de maior custo, é a suplementação. Deve ser fornecida uma fonte energética-proteica com 18% PB e 65% NDT, na base de 1% do peso vivo/dia.

No caso de uso de forragem conservada, essa deve ser de alto valor nutritivo, como a silagem de milho, em que o NDT é de 65%, ou feno amonizado, que propicia digestibilidade *in vitro* da matéria seca entre 65% e 74% (TONUCCI, 2006).

Qualquer dos procedimentos deve ser executado pelo menos 30 dias antes da estação de monta, pois os ovinos são mais sensíveis à



FIGURA 8-2. Doadoras do grupo genético pantaneiro mantidas em capim-marandu.

troca de regime de pasto, levando algum tempo para pastejar espécies forrageiras diferentes das habituais.

A mistura mineral deve estar sempre à disposição, em cochos próprios, no interior das baias e dispostos no piquete.

Este procedimento possibilita alcançar e manter a uniformidade da condição corporal satisfatória dos animais, em escore três, tecnicamente recomendado para ovelhas submetidas aos diversos programas de reprodução, acarretando a ocorrência de maiores taxas ovulatórias.

Formação de grupos baseado no escore corporal e a estratégia nutricional a ser adotada

Considerando-se um rebanho com 100 matrizes a 30 dias antes da estação sexual. Procedimentos:

- 1) Pesagem, atribuição do escore corporal, avaliação pelo método Famacha e coleta de fezes para exame de OPG.

2) Formar grupos pelo escore corporal (EC), baseado na distribuição encontrada:

Grupo 1 - 43 ovelhas com EC entre 1,6 e 2,0

Grupo 2 - 35 ovelhas com EC entre 2 e 2,5

Grupo 3 - 22 ovelhas com EC entre 2,6 e 3

Obs: Ovelhas com escore de 1,5 ou abaixo não devem ser selecionadas para reprodução.

3) Estratégias nutricionais executadas por 30 dias:

Grupo 1 - Pastagem de alto valor nutritivo e suplementação com concentrado energético-proteico na base de 2% do peso vivo do lote. Ex: peso do lote (56 kg x 43 ovelhas raça pequena) = 1.978 kg x 0,02 = 39,56 kg de suplementação diária com concentrado a base de 18% PB e 65% NDT, ministrada 2x ao dia, misturado com otimizador de performance reprodutiva (aminoácidos essenciais e vitaminas).

Grupo 2 - Pastagem de alto valor nutritivo e suplementação com concentrado energético-proteico na base de 1% do peso vivo do lote. Ex: peso do lote = 1.978 kg x 0,01 = 19,78 kg de suplementação diária com concentrado a base de 18% PB e 65% NDT, ministrada 1x ao dia, misturado com otimizador de performance reprodutiva (aminoácidos essenciais e vitaminas).

Grupo 3 - Manter em pastagem de alto valor nutritivo e acesso a legumineira de Estilosanthes Campo Grande (*Stylosanthes macrocephala* e *S. capitata*) duas vezes ao dia, 2 horas pela manhã e 2 horas pela tarde. Avaliação a cada 14 dias dos parâmetros descritos no item 1. Matrizes tratadas sucessivamente para verminose com base no OPG, devem ser eliminadas assim que possível, pois são suscetíveis à verminose.

4) Antes de a estação sexual agrupar os lotes, fazer cascarreio (tosquia de limpeza em torno da vulva, nas coxas e cauda) e desolhe (tosquia em torno dos olhos) e submeter as fêmeas à monta natural ou indução do cio.

Obs.: No caso de atraso na preparação das fêmeas para estação sexual, deve-se utilizar a estratégia adotada no Grupo 1, mencionada anteriormente, com efeito nutricional imediato. Também é aconselhado prolongar algumas das estratégias anteriormente descritas pelo período de 20 dias, para garantir uma resposta positiva da fêmea ao efeito macho quando em monta natural e prevenir a morte embrionária precoce, que pode ocorrer em qualquer técnica de reprodução utilizada (aumento de ácidos graxos não esteroidais e concentração de glicose) (KENYON ; BLAIR, 2009).

A nutrição e a ocorrência da ovulação

A alimentação influencia a fertilidade diretamente por meio do fornecimento de nutrientes específicos, os quais são necessários para os processos de desenvolvimento do folículo e a ovulação. E, indiretamente, atuam sobre as concentrações circulantes dos hormônios e outros metabólitos sensíveis aos nutrientes que são requeridos para o sucesso destes processos fisiológicos (ROBINSON et al., 2006).

O aporte nutricional é um dos fatores de maior importância na ocorrência da taxa de ovulação nos pequenos ruminantes. Os efeitos da nutrição sobre a reprodução podem ser assim definidos: efeito estático, efeito dinâmico e efeito imediato. O efeito estático é observado quando ocorre o aumento da taxa de ovulação em animais pesados, em comparação aos animais mais leves. O efeito dinâmico é constatado quando as taxas de ovulações são mais elevadas em animais que estejam ganhando peso e melhoria no escore da condição corporal por um período em torno de três semanas antes das coberturas. O efeito imediato é determinado pelo fornecimento aos animais de uma dieta energética-proteica durante um curto período de tempo, entre quatro a seis dias, antes da reprodução, sendo que não se observa aumento do peso e nem da condição corporal. Desta forma, a suplementação das ovelhas por um período de três semanas antes do período reprodutivo é o suficiente para aumentar a taxa de ovulação (GHERARDI; LINDSAY, 1982; SMITH; STEWART, 1990; MARTIN et al., 2004).

A nutrição exerce efeitos importantes sobre a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Apesar de o crescimento folicular ser controlado principalmente por meio das gonadotrofinas e por fatores de crescimento produzidos localmente, vários fatores ambientais, como o correto aporte nutricional, podem influenciar o desenvolvimento folicular e a qualidade do oócito produzido e, conseqüentemente, a taxa de fertilidade (WEBB et al., 2003).

O consumo alimentar atua sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano em vários níveis. Os fatores de crescimento são importantes no desenvolvimento inicial do folículo, considerando que gonadotrofinas são essenciais para as fases finais do crescimento folicular. Nesta fase, o folículo dominante troca sua exigência de FSH para LH. Evidências afirmam que as gonadotrofinas podem influenciar o desenvolvimento do folículo pré-antral e os fatores de crescimento podem influenciar o desenvolvimento do folículo

continuamente. Em ovelhas, este fato ocorre no período de seis meses antes dos acasalamentos ou cruzamentos, quando os folículos ovarianos emergem do pool de folículos primordiais e têm seu crescimento comprometido. Neste momento, a subnutrição reduz o número de folículos que emergem e que estarão disponíveis para o evento da ovulação (DOWNING; SCARAMUZZI, 1991; ALMEIDA et al., 2008).

O efeito benéfico da nutrição sobre a ocorrência da ovulação pode ser obtido em um curto período de tempo, como dentro de 4 a 8 dias (VIÑALES GIL, 2003). Contudo, o fato da variabilidade do momento da monta, que ocorre em rebanhos que ovulam espontaneamente, induz todas as ovelhas a receberem o estímulo nutricional por um período prolongado de suplementação nutricional iniciado, comumente, 10 dias antes da introdução dos carneiros no rebanho (ALMEIDA et al., 2008).

Nutrição de doadoras e receptoras

9



O aporte nutricional tem a finalidade de incrementar a condição corporal da fêmea antes e durante o tratamento hormonal para sincronização de estro e ovulação nas receptoras e a superovulação nas doadoras, potencializando a resposta nas taxas ovulatórias à aplicação dos hormônios exógenos. O *flushing* (Capítulo 8) pode ser conduzido com a colocação das fêmeas em pastagem alto valor nutritivo ou suplementação no cocho (Figura 9-1).

No início da gestação, o requerimento nutricional da receptora está ligeiramente superior ao de manutenção. Se a perda de massa corporal for totalmente recuperada antes das inovulações, a falta de ganho de peso nos primeiros 60 a 90 dias de gestação não deve afetar negativamente o desenvolvimento do feto. As últimas seis semanas de gestação são consideradas o período mais crítico na nutrição da fêmea. Cerca de 70% do crescimento fetal ocorre neste período e restrições alimentares podem resultar em cordeiros mais fracos ao nascimento, maior mortalidade perinatal, índice insatisfatório na produção de leite e provável ocorrência da doença do parto, a cetose.

Ao final da gestação, a receptora requer aproximadamente 50% mais alimento do que no início. Se houver limitação no forneci-



FIGURA 9-1. Matrizes submetidas ao *flushing* no cocho.

mento da proteína, podemos esperar menores taxas de nascimento. Geralmente, ocorre um consumo inadequado de fósforo durante este período, especialmente em receptoras mantidas em regime de pasto ou consumindo feno.

No terço final da gestação, as fêmeas podem ter dificuldade para consumir alimento suficiente, em virtude do aumento do útero que pode abrigar dois cordeiros e, desta forma, reduzir o espaço da cavidade abdominal. Se a dieta oferecida for à base de volumosos, poderá ocorrer insuficiente capacidade de alimentação e não serem supridos os requerimentos energéticos diários. Recomenda-se, nesse período, reduzir o volumoso e complementar a dieta com o uso de ração (MOURA FILHO; RIBEIRO, 2005).

10

Nutrição e manejo dos reprodutores em serviço



O aporte energético-proteico equilibrado consiste no principal fator modulador da eficiência do reprodutor ovino, sendo esta medida necessária antes e durante o seu serviço na monta natural controlada de forma intensiva ou como doadores de sêmen em programas de inseminação artificial.

Os reprodutores podem ser mantidos a pasto (Figura 10-1) durante o dia e recolhidos em baias durante a noite. Entretanto, o consumo de forragem e o teor de elementos essenciais ingeridos podem não ser o suficiente para suprir as exigências das diferentes categorias. Nas forrageiras existem variações nos teores minerais de acordo com a espécie, o estágio de maturação da planta, a época do ano, o tipo de solo e o nível de adubações. Desta forma, uma fonte de energia suplementar deve ser fornecida a partir de alimento com 18% PB e 65% de NDT, na base de 1% do peso vivo no período de 30 dias antes do início do trabalho reprodutivo dos carneiros e durante a estação reprodutiva. O fornecimento da mistura mineral deve estar à disposição dos animais em cochos dispostos no piquete e no interior das baias para o pernoite dos animais.



FIGURA 10-1. Pastagem formada com capim-massai para uso com reprodutores.

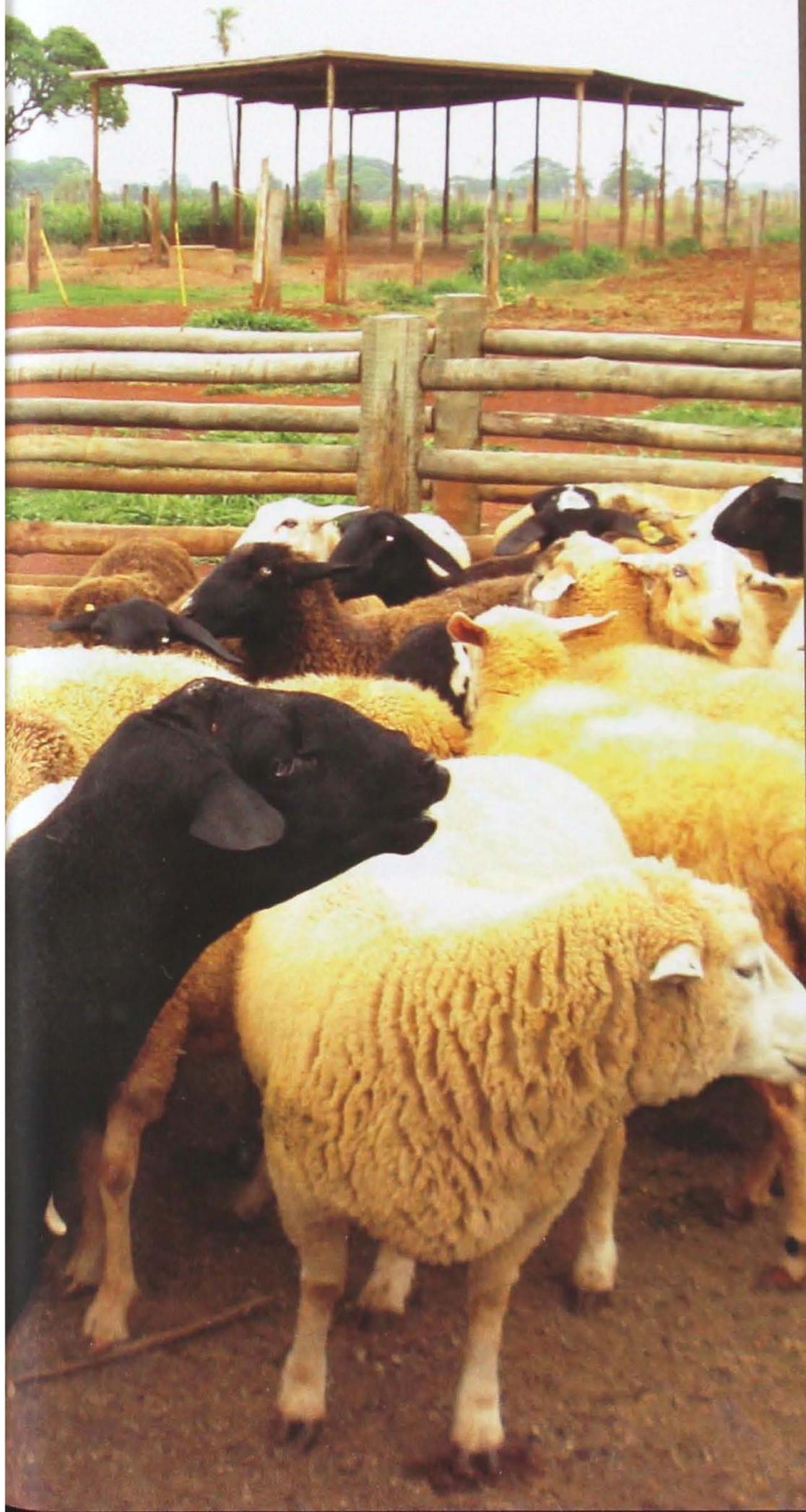
O *flushing* oferecido aos reprodutores deve proporcionar aos mesmos um escore corporal entre 3,5 a 4,0 (dentro de uma escala de classificação de 1 a 5). Desta forma, o profissional deve ter bastante critério na avaliação da condição corporal dos carneiros em função da categoria do animal, durante a pré-seleção e o cálculo da quantidade da ração em grãos a ser fornecida.

É importante o conhecimento de que a capacidade reprodutiva de carneiros submetidos a programas intensivos de monta natural – ou como doadores de sêmen para trabalhos de inseminação artificial cervical com ejaculados a fresco diluídos ou resfriado dentro de estações sexuais muito longas – e nos animais doadores permanentes de sêmen para criopreservação em centrais está diretamente relacionada com a maior concentração de células espermáticas liberadas no ejaculado (SALAMON; MAXWELL, 2000), sendo este fato correlacionado com o tamanho dos testículos (MOURA et al., 1999). Segundo Siqueira Filho (2007) para minimizarmos a ocorrência de estresse nutricional durante os programas sexuais exacerbados, período em que usualmente ocorre uma redução na ingestão alimentar, as exigências nutricionais devem ser criteriosamente atendidas em função desse status fisiológico.

Em propriedades onde os reprodutores são criados em regime extensivo em épocas fora da estação sexual, recomendam-se as seguintes medidas de manejo no período mínimo de 30 dias antes do início do serviço reprodutivo:

1. Colheita de fezes para a contagem de ovos para a avaliação da carga parasitária e, se necessário, realização da coprocultura para a identificação das larvas infestantes. Mediante o resultado, os carneiros devem ser tratados com vermífugos compatíveis ao caso clínico.
2. Realizar um acompanhamento laboratorial mensal da contagem de ovos e tratamento terapêutico caso necessário. Os animais devem ser pesados para o ajuste correto da dose do vermífugo, efetuando a mudança de princípio ativo em cada aplicação com a finalidade de evitar a resistência de helmintos.
3. Em animais mantidos essencialmente a campo é imprescindível que a propriedade tenha como rotina a rotação de pastagem. Rotacionar os animais nas pastagens a cada 5 dias para facilitar o manejo das pastagens e diminuir a reinfestação por larvas de nematódeos gastrointestinais.

4. Independentemente do controle da carga parasitária dos animais, estes devem ser vermifugados sempre antes de entrarem em nova área considerada isenta de larvas infectantes.
5. Evitar a colocação dos reprodutores em pastagens úmidas e encharcadas, pois estas áreas constituem ambiente favorável à eclosão de ovos, à sobrevivência de larvas infectantes e à ocorrência de doenças do casco.
6. Efetuar a toaleta dos cascos para propocioniar o bem-estar e preservar o desempenho adequado na monta. Esta prática deve ser executada sempre que observados problemas de aprumo dos animais.
7. Proceder a tosquia corporal total e limpeza da área genital dos machos (cascarreio).
8. Aplicar vacina completa contra todos os tipos de clostridioses, que causam a enteroxemia, doença que tem um curso rápido e mortal e que ocorre geralmente em ovinos adultos em decorrência da alteração de manejo alimentar.
9. Recomenda-se manter em piquetes separados os carneiros mais velhos dos mais jovens ou com grande diferença de porte.
10. Os piquetes onde os reprodutores forem mantidos devem permitir acesso livre ao abrigo ou a áreas sombreadas para minimizar o estresse térmico, frequentemente associado à infertilidade.
11. O percentual de machos rufiões e reprodutores de reserva deve estar entre 5% a 10%.



REPRODUÇÃO

11

Manejo das receptoras inovuladas



Fase inicial

A gestação da ovelha dura em média 150 dias (140 a 153). E quando se trabalha com estações de montas controladas e inseminação artificial de ovelhas selecionadas ou ovelhas receptoras de embriões produzidos a fresco ou criopreservados, é possível ter uma previsão da época das parições, pois estas serão concentradas em função da aplicação da reprodução programada. Com o objetivo de alcançarmos sucesso durante os partos, alguns cuidados de manejo geral, sanitário e nutricional devem ser tomados durante a gestação.

Nas ovelhas receptoras adultas, durante a fase da pré-inovulação, é importante o controle do excesso energético, o qual desencadeia acúmulo de gordura ocasionando a queda na fertilidade pela dissolução dos hormônios no tecido adiposo. Também na fase pré-púbere, o manejo nutricional incorreto pode, entre outros fatores, comprometer o desenvolvimento da glândula mamária, reduzindo desta forma o potencial da produção de leite.

A fêmea ovina pode apresentar uma relação inversa entre o seu estado nutricional após a cobertura e o aporte de progesterona, resultando em redução nas concentrações plasmáticas periféricas deste hormônio, em detrimento da ingestão de alimentos altamente energéticos, e ocasionando perdas embrionárias (WILLIAMS; CUMMING, 1982). Este fato pode ser consequência do aumento do metabolismo da progesterona, ocasionado por aumento na atividade de oxidação hepática devido ao maior fluxo sanguíneo porta-hepático em animais bem alimentados, uma vez que o fígado é o principal local de metabolismo de esteroides, pois metaboliza aproximadamente 95% da progesterona circulante durante uma única passagem – não prevenindo, desta forma, que os mecanismos luteolíticos sejam suprimidos entre o conceito e o endométrio (ASHWORTH, 1995).

Algumas medidas de manejo geral preventivo que devem ser aplicadas na ovelha gestante na fase inicial:

1. O fornecimento de uma pastagem de qualidade e suplementação mineral é suficiente para suprir as necessidades nutricionais da fêmea neste período. Caso a gestação coincida com época de escassez de alimentos verdes, os animais devem receber forragem conservada (feno ou silagem) ou suplementação concentrada balanceada compatível aos requerimentos nesta fase.

2. O transporte dos animais deve ser evitado, caso seja realmente necessário deve ser executado com cuidado.
3. Providenciar áreas de sombreamento no piquete maternidade e ter água limpa à vontade. O piquete maternidade deve estar localizado próximo ao acesso de funcionários e ser formado com forrageiras de baixo porte e alto valor nutricional (Tiftons, Cynodons), pastagem limpa, abrigada de predadores e longe de cursos d'água.
4. Realizar o controle mensal da carga parasitária.

Terço final

O terço final engloba os últimos 50 dias de gestação. Neste segundo período, ocorrem 70% do crescimento fetal e a preparação anatômica e fisiológica da ovelha para a lactação. Este é considerado o período crítico da fêmea e do(s) feto(s), pois um ambiente adverso ao bem-estar da ovelha pode ocasionar baixa produção de leite, nascimento de cordeiros debilitados, com peso abaixo da média e aumento da taxa de mortalidade perinatal (HAFEZ, E.; HAFEZ, B., 2004).

Ovelhas submetidas a uma dieta pobre em energia e proteína no final de gestação apresentam uma queda na produção de colostro durante as primeiras 18 horas após o parto. Dessa forma, nesse período da gestação das fêmeas é imprescindível o fornecimento dos requerimentos nutricionais compatíveis, sendo que isto reflete no vigor do cordeiro após o nascimento para a sua rápida ingestão do colostro, uma vez que a perda da capacidade de absorção das imunoglobulinas pelo seu intestino ocorre dentro de 24 a 48 horas após o parto. Este fato é de suma importância na sua proteção contra agentes infecciosos que podem ser fatais (MELLOR; STAFFORD, 2004).

Algumas medidas de manejo geral preventivo que devem ser aplicadas na ovelha gestante na fase final:

1. Providenciar áreas de sombreamento no piquete maternidade e ter água limpa à vontade. O piquete maternidade deve estar localizado próximo ao acesso de funcionários e ser formado com forrageiras de baixo porte e alto valor nutricional, pastagem limpa, abrigada de predadores e longe de cursos d'água.
2. Um mês antes da parição deve ser realizada a remoção da lã das fêmeas da região perivulvar e úbere. Este procedimento, denominado cascarreio, tem por finalidade favorecer o acesso dos recém-nascidos às tetas, reduzir a incidência de miíases na região

- da vulva e facilitar a higiene da ovelha após a parição. A remoção da lã ao redor dos olhos, o desolhe, melhora o contato da ovelha com o cordeiro. Em determinadas raças lanadas os animais podem ficar com os olhos vedados e a visão comprometida.
3. No último mês de gestação, as fêmeas devem ser vacinadas contra enterotoxemia, possibilitando a imunidade passiva aos cordeiros. Evitar uso de sarnicidas e manejos nas horas mais quentes do dia.
 4. O controle da carga parasitária deve ser efetuado durante toda a gestação, pois na fase final da mesma e na lactação ocorrem as maiores infestações, já que nesse período baixa a imunidade das ovelhas.
 5. Sugere-se vacinar as fêmeas no período de 30 a 45 dias antes da parição como forma de prevenir a queda na produção de leite e a debilidade corporal.
 6. Sugere-se não provocar mudanças bruscas de dieta no periparto, mantendo-se o balanço cátion-ânion da dieta. Alimentação rica em cátions (principalmente sódio e potássio) pode causar hipocalcemia ou febre do leite. O aumento na concentração de grãos ou de forragem picada em partículas muito reduzidas também pode causar acidose ruminal (acúmulo de ácidos graxos voláteis no rúmen), que provoca baixa do pH (<6).

Parto

O feto representa o papel-chave no início do parto. Os partos são distribuídos ao longo do dia. O comportamento da ovelha depende muito da facilidade de parição. Contudo, a inquietação inicial é substituída por períodos em que a mesma permanece deitada devido às dores abdominais. Não se deve interferir no parto sem necessidade e nem por algum tempo depois. Vigorosas lambidas e a ingestão de membranas fetais aderentes ao neonato começam imediatamente após o nascimento. Os fluidos fetais parecem desempenhar um papel crítico para atrair a ovelha para seu cordeiro. A maioria dos cordeiros fica em pé dentro de 15 minutos após o nascimento. Dentro de uma ou duas horas, a maior parte das ovelhas permite que o cordeiro dirija-se para o úbere. O “período crítico” de união da ovelha ao cordeiro é curto. Se o cordeiro for removido logo após o nascimento, ele será rejeitado pela mãe quando apresentado a ela 6 a 12 horas mais tarde (HAFEZ, E.; HAFEZ, B., 2004).

12

Manejo sanitário dos animais



Os animais devem ser submetidos a um manejo sanitário especializado para a espécie ovina. Isso significa um conjunto de medidas cuja finalidade é proporcionar ótimas condições de saúde aos mesmos. Com o emprego de procedimentos que compõem o manejo sanitário, objetiva-se evitar, eliminar ou reduzir ao máximo a incidência de doenças no rebanho, para que ocorra a potencialização da resposta do melhoramento genético.

Os principais problemas que podem ser identificados são decorrentes de estresse, causados principalmente pelo transporte, instalações não adequadas, fatores climáticos, como a baixa e a alta temperatura, chuva e ventos fortes, a superlotação animal e a falta de higiene correta nas baias e nos galpões. Deve ser estabelecido um cronograma de práticas sanitárias de acordo com a idade dos animais e suas necessidades, as peculiaridades das diferentes regiões, e até mesmo das propriedades, segundo a possibilidade de ocorrência de determinadas doenças. As enfermidades causadas pela infestação de helmintos gastrointestinais estão associadas aos seguintes fatores que contribuem para aumentar a sua população no organismo do animal: idade; estado nutricional, que interfere no grau de defesa imunológica do organismo; ordem do parto; estado fisiológico; raça; espécies de nematódeos; manejo dos animais; época de nascimento e de desmame; superpopulação; e introdução de animais novos no rebanho.

Medidas gerais de manejo sanitário que devem ser adotadas:

1. Evitar a superlotação, pois o excesso de animais proporciona privação de alimento, brigas e predispõe a transmissão de doenças.
2. Evitar o uso de produtos tóxicos nas habitações dos animais.
3. O controle de insetos e roedores deve ser feito com produtos seguros e nas dosagens tecnicamente recomendadas.
4. Manter os equipamentos, recipientes para comida e água sempre limpos e desinfetados.
5. Efetuar a limpeza e higienização das instalações mediante a varredura diária de todos os tipos de resíduos. Recomenda-se a desinfecção total das instalações a cada seis meses mediante o uso de desinfetantes próprios para esta finalidade por aspersão ou vassoura de fogo.
6. Observar diariamente o estado de saúde dos animais, avaliando-se o comportamento, o estado geral, o olhar, a qualidade da pele, a consistência das fezes, a presença de secreção nasal, ferimentos e fraturas.

7. Manter atualizado o histórico de vacinação, com o registro de todas as vacinas aplicadas.
8. No momento de publicar o certificado de vacinação expressar-se pela vacina oferecida pelo fabricante e pelo lote e especificar o nome do fabricante das vacinas utilizadas, com o número de lote e o ano de fabricação e o nome do veterinário responsável por administrar as vacinas de acordo.
9. Entregar, após a administração, atestados, formulários e livros de vacinação devidamente preenchidos, em triplicata, para o proprietário e cópias para o estabelecimento.
10. Realizar a limpeza dos cadernos por meio de um procedimento para prevenir doenças do zoonose.
11. Vacinar anualmente os animais, após o período de quarentena, todos os tipos de zoonoses.
12. Controlar mensalmente a carga parasitária do rebanho pela contagem de ovos por grama de fezes associado a avaliação pelo sistema Farnácia.
13. Manter um calendário rigoroso de vacinação no rebanho contra as zoonoses, zoonocônicas e de importância zoonótica.
14. Em regiões endêmicas, uma vez por ano vacinar-se contra raiva.

Diagnóstico de
gestação por
ultrassonografia
via transretal

13



O diagnóstico de gestação por ultrassonografia em ovinos consiste em importante tecnologia de aprimoramento do manejo reprodutivo e racionalização da produtividade do rebanho em estações sexuais com monta natural controlada e programas de inseminação artificial. Em trabalhos de transferência de embriões as fêmeas receptoras de embriões oriundos de pais biológicos de alto valor genético, submetidas a este procedimento precocemente, podem ser comercializadas com gestação confirmada.

Ele permite o monitoramento do crescimento do concepto no útero, possibilita a separação de receptoras vazias e intensificação do manejo geral compatível das gestantes (CHALHOUB; RIBEIRO FILHO, 2002). A ultrassonografia para detecção fetal pode ser transretal, transcutânea abdominal e transvaginal. Entretanto, a manipulação do transdutor por via transretal dispensa o uso de transdutor especial, podendo ser utilizado o transdutor linear com frequência entre 6.0 e 8.0 MHz apresentando imagens nítidas do campo uterino (DOMINGUES; TREIN, 1995).

A ultrassonografia transretal proporciona uma precocidade no diagnóstico através da visualização de estruturas entre 20 e 30 dias de gestação, quando identifica-se a vesícula embrionária que é caracterizada por uma área anecóica bem delimitada e observada logo à frente da bexiga (BICUDO, 2003). Entretanto, para o diagnóstico conclusivo, os batimentos cardíacos devem ser constatados, porque em ovelhas a visualização do fluido intrauterino durante a fase folicular e o estro podem se confundir com a vesícula embrionária nas três primeiras semanas (CHALHOUB, 2000). Nestas fêmeas, aos 15 dias de gestação, é possível identificar a expansão da vesícula embrionária no corno uterino ipsi-lateral ao ovário contendo o corpo lúteo. No entanto, entre os 17 e 20 dias, a vesícula expande-se para o corno uterino contra-lateral (BUCKRELL et al., 1986; BUCKRELL, 1988).

As principais imagens por ultrassonografia de tempo real que caracterizam a fase inicial da gestação são a presença de líquido intrauterino, visualização da vesícula embrionária, detecção de pelo menos um embrião, visualização dos batimentos cardíacos fetais, identificação da membrana amniótica, visualização da cabeça e tronco, identificação do botão germinativo dos membros, movimento embrionário/fetal, delimitação do cordão umbilical e visualização do globo ocular (SANTOS et al., 2004).

Utilizando-se o transdutor linear de 7,5 MHz por via transretal, é possível detectar a presença de líquido extra-embrionário a partir do

décimo quinto dia da cobertura, o qual se apresenta anecogênico, semelhante à urina, com forma de imagens alongadas ou circulares, cranial à bexiga. A vesícula embrionária pode ser observada entre o 17º e o 19º dia depois da cobertura, mas é difícil distinguir se é fluido intrauterino ou alongamento do trofoblasto. Desta forma, recomenda-se que o exame seja feito entre 32 a 34 dias de gestação por possibilitar acurácia em torno de 95% a 100% (Figura 13-1) (AZEVEDO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2004).

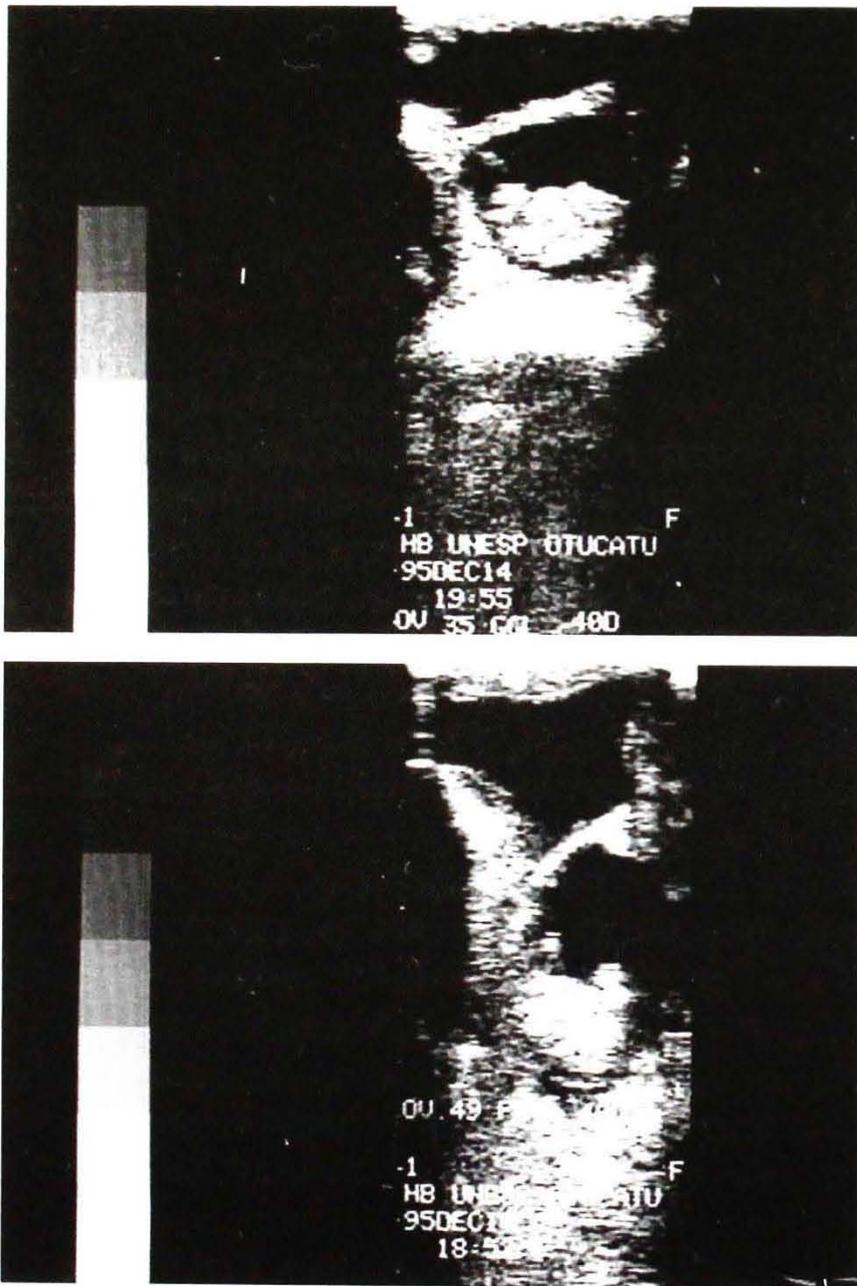


FIGURA 13-1. Imagens de gestação identificada com transdutor linear. Feto ovino com idade entre 35 a 40 dias. Fonte: Gonzalez (2009).

A determinação do sexo fetal através da ultrassonografia fundamenta-se na localização e diferenciação da genitália externa. A estrutura do feto que possibilita este diagnóstico pelo ultrassom é denominada de tubérculo genital (TG). Aos 25 dias de gestação, embriões ovinos apresentam uma discreta elevação entre os brotos dos membros posteriores, indicando a formação do TG. Entre os 28 e os 30, o TG está mais proeminente e aos 34 é possível identificar o sexo do embrião. Com o desenvolvimento do corpo do embrião e a migração do TG em direção ao umbigo nos machos e à cauda nas fêmeas, têm-se, respectivamente, a diferenciação deste órgão em pênis e clitóris. A partir deste período, a distância entre o ânus e o TG, será maior no macho do que na fêmea. A sexagem ultrassonográfica é possível a partir dos 40 dias, tendo o TG como parâmetro. Entretanto, o recomendável é entre 50 e 58 dias de idade do concepto. Esta atividade conduzida corretamente é de grande importância para a produção animal por permitir o planejamento comercial da propriedade e, principalmente, a sexagem de embriões de alta seleção genética (CURRAN et al., 1989; COUGHBROUGH ; CASTELL, 1998; REINCHENBACH et al., 2004, ANDRADE et al., 2004; SANTOS et al., 2006).

Referências

- ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245-1250, 2003
- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p.239-249, 2005.
- ALMEIDA, A. P.; SOUZA, A. L.; MENEZES E. S. B.; ARRUDA, I. J.; RONDINA, D. **Recentes avanços na relação entre nutrição e reprodução em ruminantes**. 2008. Disponível em: <<http://www.neef.ufc.br/pal04.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2011.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ANDRADE, J. C. O.; GUIDO, S. I.; SOUSA, B. P. A. Sexagem fetal em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.185, 2004.
- ANEL, L.; PAZ, P. de; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C. A.; BOIXO, J. C.; MANSO, A.; GONZALEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram sêmen. **Theriogenology**, v.60, p.1293-1308, 2003.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, E.; PAZ, P. de. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction of Domestic Animals**, v.41, n.2, p.30 - 42, 2006.
- ASHWORTH, C. J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v.44, p. 99-105, 1995.
- AZEVEDO, H. C.; CHALHOUB, M.; FURST, R.; MOURA NETO, A.V.; RIBEIRO FILHO, A. I. Momento da detecção ultrassonográfica de algumas características do concepto Santa Inês do 200 a 460 dia de prenhez. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.147-148, 2001.
- BAIRD, D. T.; MCNEILLY, A. S. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrus cycle of the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, Londres, v. 30, p. 119-133, 1981. Supplement.
- BALDASSARRE, H. Recolección, conservación y transferencia embrionária. In: AISEN, E. G. **Reproducción ovina y caprina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2004. Capítulo 11, p. 143 – 152.
- BARIL, G.; SAUMANDE, J. Hormonal treatments for control time of ovulation and fertility of goats. In: INTERNATIONAL E CONFERENCE ON GOAT,7., 2000. Nouzilly – France: **Proceedings...** Nouzilly - France: IGA, 2000. v.1, p. 4000 - 4005.
- BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **Journal of Andrology**, v.27, p.588-595, 2005.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M. H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2007.

- BERLINGUER, F.; LEONI, G. C.; SUCCU, S.; MOSSA, F.; MADDEDU, M.; NAITANA, S. Cryopreservation of European mouflon semen during the non-breeding season is enhanced by the use of trehalose. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n.2 p.202-207. 2007.
- BICUDO, S. D. Sumários de Pesquisas. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA 6., 2002, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Associação Paulista dos Criadores de Ovinos, 2002. p. 88-100.
- BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas Suffolk. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL 15., 2003, Porto Seguro – BA. **Anais...** Porto Seguro: CBRA, 2003. p. 1-2.
- BICUDO, S. D. **O diagnóstico ultrassonográfico de gestação em ovinos.** Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/repman3.htm>>. 2003. Acesso em: 6 dez. 2010.
- BICUDO, S. D. **Sistemas de acasalamento em ovinos: monta natural e inseminação artificial.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista - UNESP. Disponível em:<<http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/repman1.htm>>. 2005. Acesso em: 6 dez. 2010.
- BITTENCOURT, R. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; BISCARDE, C. E. A.; FREITAS, D. S.; FERREIRA, A. B. C.; RIBEIRO FILHO, A. de L. Circunferência escrotal em carneiros da raça Santa Inês em dez categorias de idade e sua relação com peso corporal, idade e medidas corporais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.180. 2004. Suplemento. Edição dos Anais da XVIII Reunião da SBTE, 2004.
- BRISOLA, L. B. S.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C. de; MONTAGNER, M. M. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 527-531, 1999.
- BUCKRELL, B. C; BONNET, B. N.; JOHNSON, W. H. The use of realtime ultrasound rectally for early pregnancy diagnosis in sheep. **Theriogenology**, v. 25, p. 665-673, 1986.
- BUCKRELL, B. C. Applications of ultra-sonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, v.29, p.71-84, 1988.
- CARVALHO, F. P. de; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G. V. de; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P. de. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n. 3, p 53-56, 2008.
- CAVALCANTE, J. M. M. **Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou Tris.** 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal), Universidade Estadual do Ceará.
- CHALHOUB, B. M. **Aspectos ultrassonográficos e aspecto hormonal da gestação ovina (*Ovis Aires*) nas raças Bergamácia e Ideal.** 2000. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- CHALHOUB, B. M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes por ultrassonografia de tempo real. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p.27-30, 2002. Supplement 5.
- CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y. L'effetbouc: mecanismes physiologiques. In: REPRODUCTION des Ruminants en Zone Tropicale, Pointe à Pitre (F.W.I.). Paris : INRA Publications, 1984. p. 473-484.

- CHIBA, L. I. **Animal nutrition handboock**. 2009. Section 16: Sheep nutrition and feeding. p.426- 446. Disponível em: <<http://umkcarnivores3.files.wordpress.com/2012/02/animal-nutrition2.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2012.
- COELHO, L. A. **Estudo sobre a atividade cíclica reprodutiva e o perfil plasmático de melatonina em fêmeas ovinas, sob fotoperíodo natural, no estado de São Paulo**. 2001. 127 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2.ed., Belo Horizonte: CBRA. 1998. 49 p.
- CORDEIRO, M. F.; LOPES JÚNIOR, E. S.; FARIAS, L. N. Effect of repeated superovulation treatment on estrus, ovulation rate and embryo production in Santa Inês ewes. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.764, 2002. Proceedings of the CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. Foz de Iguaçu 2002.
- COUGHBROUGH, C. A.; CASTELL, M. C. Fetal sex determination by ultrasonically locating the genital the genital tubercle in ewes. **Theriogenology**, v.50, p.263-267, 1998.
- CORNER, R. A; KENYON, P. R. The effect of mid-pregnancy shearing and litter size on lamb birth weight and postnatal plasma cortisol response. **Small Ruminants Research**, v. 73, p. 115-121, 2007.
- CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E.; BUENO, M. S.; VERÍSSIMO, C. J. **Produção de ovinos para corte**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2004. 176 p. (Série Tecnologia APTA. Boletim técnico, 48).
- CURRAN, S.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. **Animal Reproduction Science**, v.19, p.217 -227, 1989.
- DELGADILLO, J. A. Características anatômicas y funcionales del sistema reproductor del macho. In: AISEN, E. G. **Reproducción ovina y caprina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2004. Capítulo 1, p.1-10.
- DIAS, E. F. E.; FERNANDEZ, D. R. P.; AGUIAR, G.V.; LOPES JÚNIOR, A. B. S.; FREITAS, V. J. F. Sincronização do estro em ovelhas deslanadas com diferentes doses de Ecg (equine Chorionic Gonadotrophin). In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE CAPRINO - OVINOCULTURA 5., 1999, Recife. **Anais...** Recife,1999. p.320 - 321.
- DIAS, E. F. E.; LOPES JÚNIOR, A. B. S.; VILLAROEL, D.; AGUIAR, G. V. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p. 618-623, 2001.
- DIXON, A. B.; KNIGHTS, M.; PATE, J. L. Reproductive performance of ewes after 5 days treatments with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of Prostaglandin F2 alfa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41 p.142 – 148, 2006.
- DOBRINSKY, J. R. Advancements in cryopreservation of domestical animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285 – 302, 2002.
- DOMINGUES, E.; TREIN, E. Diagnóstico de gestação em ovinos através de ultrassonografia. **A Hora Veterinária**, v. 15, n.87, p. 58-61, 1995.
- DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.43, p.209-227, 1991.
- DRYMUNDSON, J. L. L. Effect of rams on the onset of breeding activity in Clun Forest ewe lambs. **Journal of Agricultural Science**, v.79, p. 269-271, 1976.

- EL-ALAMY, M. A.; FOOTE, R. H. Freezability of spermatozoa from finn and dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p.245-254, 2001.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Insemination. In: _____. Inseminación artificial de ovejas y cabras. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990. p.143-165.
- EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; CROSBY, T. F.; HAWKEN, P. A. R.; BOLAND, M. P.; BEARD, A. P. Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronisation and fertility during the breeding season in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.84, p. 349-358, 2004.
- FAHY, G. M.; LEVY D. I.; ALI, S. E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solution. **Cryobiology**, v.24, p. 196-213, 1987.
- FERNANDEZ-JUAN, M.; GALLEGU, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.27, n.4, p. 588-595, 2006.
- FRANCO, P. P. M. M.; SILVA, T. A. de S. N.; LEAL, T. L. R. D. R.; PASSOS, P. I. B.; NEVES, J. P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1154-1159, 2010.
- FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 454 p.
- GELEZ, H.; FABRE-NYS, C. The "male-effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. **Hormones and Behaviour**, v.46, p.257-271, 2004.
- GHERARDI, P. B.; LINDSAY, D. R. Response of ewes to lupin supplementation at different times of the breeding season. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.22, p.264-267, 1982.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Current state in semen preservation. **Reproduction Fertility Development**, v.16, n.4, p.447-454, 2004.
- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p. 1157-1170, 2003.
- GILBERTI, M. A. **Identificação do intervalo de tempo fixo para o emprego da inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado em ovelhas Santa Inês** 2007. 25 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrus cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 689-703, 1995.
- GONZALEZ, C. I. M. **Avaliação In vitro e In vivo de sêmen ovino (Ovis áries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores**. 1996. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária; Área de Reprodução Animal), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.
- GONZALEZ, C. I. M.; SOARES, A. T.; CUNHA, M. G. G. Protocolo para superovulação de ovelhas Santa Inês no semiárido da Paraíba. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. v.3, p.801 - 803.
- GONZALEZ, C. I. M.; SOARES, A. T. Programa de transferência de embriões ovinos das raças Dorper e Damara oriundos da África do Sul. In: SIMPÓSIO

- INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003. **Anais...** João Pessoa: PB. EMEPA - PB, 2003, p.655.
- GONZALEZ, C. I. M.; SOARES, A. T.; COSTA, H. A. Preservação ex situ de germoplasma de ovino Santa Inês. In: PROJETO COLEÇÕES BIOLÓGICAS. **Relatório final**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 5 p.
- GONZALEZ, C. I. M.; SILVA, G. A.; SOARES, A. T. Influência do horário da inseminação por laparoscopia sobre a taxa de prenhez em ovelhas da raça Santa Inês no semiárido paraibano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa-PB. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006a, p. 1-3. 1 CD-ROM.
- GONZALEZ, C. I. M.; GOMES, M. G. C.; SILVA, G. A. Monta natural controlada de forma intensiva no ovino Santa Inês. In: PROJETO APLCAPRI/MCT/FINEP/CNPq/EMEPA/UFPB/SECTMA: REPRODUÇÃO ASSISTIDA DA CAPRINO E OVINO CULTURA. **Relatório técnico final**. João Pessoa: FINEP, 2006b, p. 1-49.
- GONZALEZ, C. I. M. Potencialidades reprodutivas da raça Santa Inês. In: ENCONTRO NACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 1., 2006, . **Anais...** Campina Grande: EMEPA-PB, 2006. p.1- 40. 1 CD-ROM.
- GONZALEZ, C. I. M. Reprodução assistida em ovinos lanados e deslanados. In: CÍRCULO DE PALESTRAS SOBRE A OVINO CULTURA, Santa Maria - RS. [Palestras]. Santa Maria, RS: Laboratório EMBRYOLAB–Setor de Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, 2009.
- GRAHAM, E. F. Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar sêmen. **A.I. Digest**, v.19, p.12, 1971.
- GREEN, R. E. **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos**. 2005. 35 p. Monografia. (Graduação). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista, Botucatu.
- GUNN, R. G.; DONEY, J. M.; SMITH, W. F. The effect of level of pre-mating nutrition on ovulation rate in Scottish Black ewes in different body condition mating. **Animal Production**, v. 39, p. 235-239. 1984.
- GUSMÃO, A. L.; MOURA, J. C. A. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. In: SIMPÓSIO SOBRE TÓPICOS AVANÇADOS EM BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO, 2005. Jaboticabal-SP. **Anais...** Jaboticabal: Universidade Estadual de Jaboticabal – SP, 2005. p.1-13. 1 CD-ROM.
- GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; BARBOSA, L. P. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no Semiárido Nordestino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.1, p. 1-10, 2007.
- GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.2, p. 313-318, 2009.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.
- HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S. Field evaluation of a technique for transcervical intra-uterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v.33, n.6, p.1231-1243, 1990.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p. 343-352, 1990.

- HAWKEN, P. A. R.; BEARD, A. P.; O'MEARA, C. M.; DUFFY, P.; QUINN, K. M.; CROSBY, T. F.; BOLAND, M. P.; EVANS, A.C.O. The effects of ram exposure during progestagenoestrus synchronisation and time of ram introduction post progestagen withdrawal on fertility in ewes. **Theriogenology**, v.63, p. 860-871, 2005.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology, the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, p. 473-483, 1984.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 78, p. 447-457, 1986.
- HORTA, A. E. M.; CAVACO GONÇALVES, S. Bioestimulação pelo efeito macho na indução e sincronização da actividade ovárica em pequenos ruminantes. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA "SABER PRODUZIR, SABER TRANSFORMAR", 16., 2006, Castelo Branco-Portugal. **Anais...** Castelo Branco-Portugal: Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 2006. p. 1-14.
- JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; HORN, A. P.; MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 2053-2062, 2005.
- KARSCH, F. J. Endocrine and environmental control of oestrus cyclicity in sheep. **Reproduction in Sheep**, v.1, p. 10 -15, 1984.
- KENYON, P. R.; BLAIR, H. T. The effect of ewe size and nutritional regimen beginning in early pregnancy on ewe and lamb performance to weaning. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 52, p. 203-212, 2009.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R. J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225-1235, 2005.
- KNIGHT, T. W. Are rams necessary for stimulation of anoestrous ewes with oestrous ewes? **Proceedings of the New Zealand Society Animal Production**, v. 45, p.49-50, Jan. 1985.
- KOVÁCS, A.; FOOTE, R. H. Viability and acrossome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic Histochemistry**, v. 67, n. 3, p. 119-124, 1992.
- LASSOUED, N.; KHALDI, N.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; THIMONIER, J. Role of the uterus in early regression of corpora lutea induced by the ram effect in seasonally anoestrous Barbarine ewes. **Reproduction Nutriment and Development**, v. 37, p.559-571, 1997.
- LIMA, I. M. T.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A influência do peso ao parto e da estimulação hormonal sobre a taxa de fertilidade de ovelhas Santa Inês. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 42., 2005, Goiânia. **A produção animal e o foco no agronegócio: anais**. Goiânia: SBZ, 2005. 1 CD-ROM.
- LOPES JÚNIOR, E. S.; RONDINA, D.; SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. de F. Atividade estral e ovulatória em caprinos. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v.4, n.1, p.199-210, 2001.
- LUZ, S. L. 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**, v. 37, n. 2, p. 136-140, 2000.
- LYNCH, J. J.; HINCH, G. N.; ADAMS, D. B. **The behaviour of sheep**. Wallingford : CAB International and East Melbourne ; Victoria : CSIRO Publications, 1992. 237 p.
- MAIA, M. S.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Efeito da adição de Equex - STM ao diluente Tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.311, 2005. Suplemento I.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.
- MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; FARRANT, J.; CHU, E. H. Y.; HANNA, M. J.; SMITH, L. H. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: WOLSTENHOLME, G. E. W.; O'CONNOR, M. (ED.). **Ciba Foundation Symposium – the frozen cell**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1970. p.69-85.
- MARTIN, G. B.; OLDHAM, C.M.; COGNIER, Y. The physiological responses of anovulatory ewes to introduction of rams – a review. **Livestock Production Science**, v.15, p.219 - 247, 1986.
- MARTIN, G. B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.491-501, 2004.
- MATHIS, C. P.; ROSS, T. (Ed.). **Sheep production and management**. New Mexico: New Mexico State University: Cooperative Extension Service, College of Agriculture and Home Economics, 2000. 37p. Disponível em: <http://aces.nmsu.edu/pubs/_b/100B15.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2012.
- MCDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. **Endocrinología veterinaria y reproducción**. 4.ed. México: Editora Interamericana, 1991. 551p.
- MCNEILLY, A. S.; PICTON, H. M.; CAMPBELL, B. K. Gonadotropic control of follicle growth in the ewe. **Journal Reproduction Fertility**, p.177 - 186, 1991. Supplement 23.
- MCWILLIAM, E. L.; BARRY, T. N.; LOPEZ-VILLALOBOS, N. ; CAMERON, P. N., KEMP, P. D. **The effect of different levels of poplar (*Populus*) supplementation on the reproductive performance of ewes grazing low quality drought pasture during mating**. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037784010400077X>>. Acesso em: 7 set. 2011.
- MEDINA, V. H. **Uso de sondas fluorescentes na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides recém colhidos e submetidos à congelação**. Jaboticabal. 1995. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 2, p. 118-133, 2004.
- MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. St. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryopreservation. **Cryobiology**, v. 14, p. 287-302, 1977.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L. E.; LUZ, S. N.; NEVES, J. P. Inseminação artificial intrauterine e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.35 - 39, 2000.
- MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO,

- JÚNIOR; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo : Varela, 2002. p. 25-55.
- MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatómicas y funcionales del sistema reprodutor de la hembra. In: AISEN, E. G. **Reproducción ovina y caprina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2004. Capítulo 2, p. 11 - 24.
- MOOR, R. M.; OSBORN, J. C.; CROSBY, I. M. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? **Theriogenology**, v.21, n.1, p.103 - 106, 1984.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- MOURA, A. de A. A.; SOUZA, C. E. A.; GARCIA, F. C. de H.; OLIVEIRA NETO, J. B. Desenvolvimento ponderal e testicular em carneiros Santa Inês no estado do Ceará. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 36., 1999. Porto Alegre. **Anais...Porto Alegre**: SBZ, 1999. p.113.
- MOURA, P. P.; THIAGO, M. M. F.; SILVA, A. S. N.; RAMOS, T. L. D. R.; PASSOS, P. I. B.; NEVES, J. P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1154-1159, 2010.
- MOURA FILHO, J.; RIBEIRO, E. L. A. Suplementação alimentar de ovelhas no terço final da gestação: desempenho de ovelhas e cordeiros até o desmame. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, n.2. p. 257-266, 2005.
- NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive Technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**, v.39, p.199-208, 2005.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p. 109 -124, 1991.
- NOWSHARI, M.; HOLTZ, W. In vitro culture of goat morulae to blastocysts before freezing. **Theriogenology**, v. 44 , p.983-988, 1995.
- NÖTHLING, J. O.; IRONS, P. C. A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. **Theriogenology**, v. 69, p. 603-611, 2008.
- NÚÑEZ-MARTINEZ, I.; MORAN, J. M.; PEÑA, F. J. Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? **Zygote**, v. 15, p. 257-266, 2007.
- OLIVEIRA, M. A. L.; REICHENBACH, HORST-DIETER; SANTOS, M. H. B.; FILHO, F. T. Aplicabilidade do Scan B na reprodução de pequenos ruminantes. In: SANTOS, M. H. B. dos; OLIVEIRA, M. A. L. de; LIMA, P. F. de. (Ed.). **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. Capítulo 13, p.85 - 96.
- PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produce ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v.74, p. 35 - 44, 2002.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209 - 222, 1992.
- PENDLENTON, R. J.; YOUNG, C. R.; RORIE, R. W. Follicle stimulating hormone versus pregnant mare serum gonadotrophin for superovulation of dairy goats. **Small Ruminant Research**, v.8, n.3, p.217 - 224, 1992.
- PILAR, R. de C.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, C. L. dos. Manejo reprodutivo da ovelha: recomendações para uma parição a cada 8 meses. Lavras: UFLA, 2002. 28 p. (UFLA. **Boletim técnico**, n.50).

- PINHEIRO, J. H. T.; DIÓGENES, B. O. P.; MONTEIRO, A. W. U. Fertilidade de fêmeas ovinas deslanadas inseminadas artificialmente quanto ao local de deposição do sêmen no aparelho reprodutor. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n. 3, p. 336-338, 2001.
- PEREIRA NETO, O. A. **Práticas em ovinocultura – ferramentas para o sucesso**. Porto Alegre, RS: SENAR-RS, 2004. 146 p.
- PÉREZ-PÉ, R.; CCBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 425-434. 2001.
- POLI, C. H. E. C.; CARVALHO, P. C. de F. Alimentação – requerimentos nutricionais de ovinos. In: OLIVEIRA, N. M. de. (Ed.). **Sistemas de criação de ovinos nos ambientes ecológicos do Sul do Rio Grande do Sul**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2003. p.67-72. (Embrapa Pecuária Sul. Sistema de produção, 2).
- POLI, C. H. E. C.; MONTEIRO, A. L. G.; BARROS, C. S.; MORAES, A.; FERNANDES, M. A. M.; PIAZETTA, H. von L. Produção de ovinos de corte em quatro sistemas de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n.4. p. 666-673. 2008.
- PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 511 p.
- PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L. L.; JOHNSON, L. A. Effect of orvuses paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. **Journal Animal Science**, v.47, p.198-202, 1978.
- RIBEIRO, L. A. O.; FONTANA, C. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATOS, R. C. Relação entre a condição corporal e a idade das ovelhas no encarneamento com a prenhez. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.357-361, 2003.
- REINCHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; FILHO, A. S. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, JR.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 127-77.
- REINCHENBACH, H. D.; SANTOS, M. H. B. dos; OLIVEIRA, M. A. L. dos; BURSTEL, D. M.; TILLMANN, S. M. Sexagem fetal na cabra e na ovelha por ultrassonografia. In: SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. (Ed.). **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. Capítulo 15, p.117-136.
- REINCHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; FILHO, A. S. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F** (eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo. Livraria: Roca, 2008. p.201-240.
- ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; MITCHELL, L. M.; MCEVOY, T. G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v.126, p.259–276, 2006.
- ROCHA, R.; BRAGANÇA, J. F.; ZIELINSKY, C.; LEAL, M. L.; CECIM, M. Resposta reprodutiva de ovelhas a tratamentos com progestágenos por 6 ou 12 dias associados a análogos de prostaglandina. **A Hora Veterinária**, n. 174, p. 50 – 51, 2010.
- ROMANO, J. E; CHRISTIANS, C. J.; CRABO, B. G. Continuous presence rams hastens the onset of estrus in ewes synchronized during the breeding season. **Applied Animal Behaviour Science**, v.66, p.65 - 70, Feb. 2000. Issues 1-2.
- ROMANO, J. E.; FERNANDEZ ABELLA, D.; VILLEGAS, N. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes. **Applied Animal Behaviour Science**, v.73, p.193 - 198, 2001. Issue 3.

- ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. The "ram effect" as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. **Small Ruminant Research**, v.45, p. 1-16, 2002.
- RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiología reproductiva en cabras y ovejas. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000. São Paulo. **Anais...** São Paulo: FMVZ-USP, 2000. p. 1-5.
- RUMPE, R.; BEM, A. R.de; PEIXER, M. A. S.; SOUSA, R.V.de; ROSAS, C. de A.; LUNA, N. M.; SILVA, A. E. D. F. da; ZANENGA, C. A.; MALARD, P. F. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000 184 p.
- RUSSEL, A. J. F.; DONEY, J. M.; GUNN, R. G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 72, p. 451-454, 1969.
- SÁ, C. O. Manejo reprodutivo para intervalo entre partos de oito meses. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA, 5., 2002, Botucatu. **Anais...** Botucatu: ASPACO : FMVZ/UNESP, 2002. p.8-20.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M.C. Frozen storage of ram semen.I. Processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p. 185-249, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.
- SAMARTZI, E.; BOSCOS, C.; VAINAS, E. Superovulatory response of chios sheep to PMSG during spring and autumn. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.215 - 22, 1995.
- SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA, M. A. L.; MORAES, E. P. B. X. de; CHALHOUB, M.; BICUDO, S. D. Diagnóstico de gestação por ultrassonografia de tempo real. In: SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. (Ed.). **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. Capítulo 14, p.79 - 116.
- SANTOS, M. H. B. dos; MORAES, E. P. B. X. de; GUIDO, S. I.; BEZERRA, F. Q. G.; MELO, A. N.; LIMA, P. F. de; OLIVEIRA, M. A. L. de. Sexagem fetal em ovelhas Santa Inês por ultrassonografia. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.573-578, mar. abr. 2006.
- SANCHÉZ- PARTIDA, L. G. Proline and Glycine Betaine in cryoprotective diluents for RAM spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v. 4, p. 113-118, 1992.
- SANTIN, T. R.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 571-574, 2009.
- SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; TASDEMIR, U.; KINET, H.; ULUTAS, P. A. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic – oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 3, p. 316-323, 2010.
- SASA, A.; HOTTA, R. M.; SILVA, C. C. M. Utilização do efeito macho em ovelhas de diferentes graus de estacionalidade reprodutiva em época de anestro sazonal no estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2003. Santa Maria – RS. **Anais...** Santa Maria. SBZ, 2002. p.1-5.
- SCARAMUZZI, R. J.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G. A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**. v.5, n.5, p. 459-478, 1993.

- SILVEIRA, K. B. X. da; KOZICKI, L. E. Superovulação em ovelhas Suffolk durante o anestro sazonal com FSH e PMSG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, n.3, p.339-341, 2001.
- SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABÉCIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction of Science**, v.104, p.227-237, 2008.
- SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões em caprinos no Brasil – estágio atual e perspectivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1., 2000, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2000. p.169-182.
- SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaico of the structure of cells membranes. **Science**, n. 175, p. 720 - 731, 1972.
- SIQUEIRA FILHO, E. R. **Influência dos níveis proteicos fornecidos na dieta sobre o sistema reprodutivo de carneiros**. 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.
- SMITH, A. J.; STEWART, R. D. Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. In: **OLDHAM, C. M.; MARTIN, G. B.; PURVIS, I. W.** (Ed.). Reproductive physiology of Merino sheep concepts and consequences. Perth: School of Agriculture (Animal Science), The University of Western Australia, 1990. p.85-101.
- SOARES, A. T.; GONZALEZ, C. I. M.; SOUSA, W. H.; CUNHA, M. G. G.; STEYN, J. J. Sobrevivência embrionária em receptoras de embriões criopreservados na espécie caprina: efeito da classificação embrionária. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. v.3, p.781 – 783.
- SOARES, A. T.; GONZALEZ, C. I. M.; SOUSA, W. H. de. Sincronização do estro e ovulação em receptoras de embriões ovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE 2., 2003. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2003. p.1-3. 1 CD-ROM.
- SOARES, A. T.; GONZALEZ, C. I. M. Sobrevivência de embriões criopreservados em ovinos da raça Dorper: Efeito do número de embriões inovulados. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÃO, 21, 2007, Salvador. **Anais...** Salvador: SBTE, 2007. p. 1-13. 1 CD-ROM.
- SORMUNEN-CRISTIAN, R.; JAUHAINEN, L. Comparasion of hay and silage for pregnant and lactating Finnish Landrace ewes. **Small Ruminat Research**, v.39, n.1, p. 47-57, 2001.
- SORMUNEN-CRISTIAN, R.; JAUHAINEN, L. Effect of nutritional flushing on the productivity of Finnish Landrace ewes. **Small Ruminat Researc**, v.43, n.1, p. 75-83, 2002.
- STEYN, J. J. Embryo transfer in sheep and goats in South Africa – present state and future perspectives. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1., 2000. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2000. p.183-188.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (ED.). **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3. Ed. Illinois: SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1998. 180 p.
- TALBOT, P.; CHACON, R. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, p. 201-208, 1991.
- TONUCCI, R. G. **Valor nutritivo do feno de capim-tifton 85 amonizado com ureia**. 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- TONIETO, R. A. **Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- UNGERFELD, R. Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p. 479-490, 2004.
- VALLERIOTE, P. S.; DIAS, A. J. B.; CARVALHO, F. P. de; PAES SOBRINHO C. Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 310, 2005. Supl. 1.
- VASQUES, M. I.; CAVACO-GONÇALVES, S.; MARQUES, C. C.; BARBAS, J. P.; BAPTISTA, M. C.; CUNHA, T. P.; HORTA, A. E. M. The effect of ram exposure previous to progestagenoestrus synchronization on corpus luteum function and fertility in crossbred ewes. In: RIBEIRO, J. M. C. R.; HORTA, A. E. M.; MOSCONI, C.; ROSATI, A. (Ed.). **Animal products from the Mediterranean area**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 343-348. (EAAP publication No. 119). Disponível em: <<http://horta.0catch.com/acmh/57FP%20Vasques.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2012.
- VERSTEGEN, J. M.; IGUER-OUADA; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- VILELA FILHO, M. H.; FIGUEIRÓ, P. R. P. Efeito do manejo no acasalamento sobre a fertilidade de borregas Corriedale. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. Uruguaiana, v.1, n.1, p.6-10, 1994.
- VIÑALES GIL, C. **Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe**. 2003. Tese (Doutorado). 71 f. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- VIU, M. A.O. de; FILHO, B. D. O. de; LOPES, D. T.; VIU, A. F. M.; SANTOS, K. J. G. dos. Fisiologia e manejo reprodutivo de ovinos: revisão. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n.1, p. 79-98, 2006.
- WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. **The effects of low temperatures on biological elements**, v.1, p.189-218, 1981.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.7, p.871-891, 1995.
- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction in Domestic Ruminants**, p.71-90, 2003. Supplement 61.
- WILLIAMS, A. H.; CUMMING, I. A. Inverse relationship between concentrations of progesterone and nutrition in ewes. **Journal of Agricultural Science**, v.98, p.517-522, 1982.
- WILMUT, I.; SALES, D. I.; ASHWORTH, C. J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. **Theriogenology**, v.23, p.107-119, 1985.
- WRIGHT, P. J.; GEYTENBEEK, P. E.; CLARKE, I. J. The influence of nutrient status of post-partum ewes on ovarian cyclicity and on the oestrus and ovulatory responses to ram introduction. **Animal Reproduction Science**, v.23, p.293 - 303, 1990.

Impressão e acabamento
Cromosete Gráfica e editora Ltda.
<http://www.cromosete.com.br/>