



Ressincronização de estro em ovinos utilizando duas ou três inseminações artificiais com sêmen congelado

Resynchronization of estrus in sheep using two or three artificial inseminations with frozen semen

Jéssica Drechmer¹, Lucas Macêdo Santos Basílio¹, Heitor Castro Alves Teixeira², Alexandre Floriani Ramos², Bianca Damiani Marques Silva²

¹ Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal, Brasília, Brasil

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal, Brasília, Brasil

*autor correspondente: bianca.damiani@embrapa.br

Resumo: Objetivou-se avaliar a eficiência de duas ou três sincronizações de estro seguida da inseminação artificial (IA) por laparoscopia com sêmen congelado em ovinos. As ovelhas Santa Inês (n=147) foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Re-sync – 2IATF (n=72) e Doppler - 3IATF (n=75), sincronizadas com protocolo curto associado ao GnRH e IA por laparoscopia com sêmen congelado 50 horas após a retirada do dispositivo P4 (D0). No grupo Re-sync foram realizadas duas IA com início do protocolo de ressincronização em D23 e diagnóstico gestacional em D30, as fêmeas não gestantes eram inseminadas novamente. No grupo Doppler as ovelhas foram ressincronizadas (D10) e o diagnóstico de gestação realizado precocemente aos 17 dias, com auxílio da ultrassonografia Doppler. As fêmeas vazias eram inseminadas novamente, totalizando três inseminações em 42 dias. Os diagnósticos precoces de gestação foram confirmados com 30 dias. Re-sync (29,16%) e Doppler (21,33%), foram semelhantes entre si na taxa de prenhez acumulativa ($P>0,05$). Os indicadores da técnica de diagnóstico de não-gestação aos 17 dias foram: sensibilidade 100%, especificidade 28%, valor preditivo positivo 21,3%, valor preditivo negativo 100% e acurácia 39,8%. Com o auxílio do diagnóstico precoce as ovelhas puderam ser inseminadas de duas a três vezes no mesmo período e mostrou efetividade em diagnosticar as fêmeas verdadeiramente não gestante. Conclui-se que a ressincronização de estro associada a IA por laparoscopia utilizando sêmen congelado pode ser aplicada em ovinos, entretanto não foi possível alcançar maior taxa de prenhez com duas ou três inseminações ao final da estação de monta.

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

Recebido: 04 de agosto, 2023. Aceito: 23 de outubro, 2023. Publicado: 16 de janeiro, 2024.

Abstract: This study aimed to evaluate the efficiency of two or three estrus synchronizations followed by artificial insemination (AI) by laparoscopy with frozen semen in sheep. Santa Inês sheep (n=147) were randomly distributed into two groups: Re-sync - 2FTAI (n=72) and Doppler - 3FTAI (n=75), synchronized with a short protocol associated with GnRH and AI by laparoscopy with frozen semen 50 h after removing the P4 device (D0). Two AIs were performed in the Re-sync group, with the start of the resynchronization protocol on D23 and gestational diagnosis on D30; the non-pregnant females were inseminated again. The sheep were resynchronized (D10) in the Doppler group and the gestation diagnosis was made early at 17 days using Doppler ultrasound. The open females were inseminated again, totaling three inseminations in 42 days. Early gestation diagnoses were confirmed at 30 days. Re-sync (29.16%) and Doppler (21.33%) were similar to each other in terms of cumulative gestation rate ($P>0.05$). The indicators of the non-gestation diagnosis technique at 17 days were sensitivity of 100%, specificity of 28%, positive predictive value of 21.3%, negative predictive value of 100%, and accuracy of 39.8%. Early diagnosis allowed sheep to be inseminated two to three times in the same period and was effective in diagnosing truly non-pregnant females. Therefore, estrus resynchronization associated with AI by laparoscopy using frozen semen can be applied in sheep, but a higher gestation rate could not be achieved with two or three inseminations at the end of the breeding season.

Keywords: FTAI; Doppler ultrasound; diagnosis of early gestation; laparoscopy; animal reproduction

1. Introdução

A sincronização de estro em ovinos é uma ferramenta reprodutiva que permite a concentração de partos em épocas desejáveis e facilita o emprego da IA pela redução do período de controle de estros e mesmo para utilização da IATF ⁽¹⁾. A melhoria nos protocolos de sincronização de estro é crucial para melhorar os índices reprodutivos, e para o aumento do uso da IA. Portanto, é necessário melhorar os protocolos de indução de estro e sincronização da ovulação, para determinar com precisão o melhor momento para IA, e obter CL mais funcionais, com melhor produção de progesterona para manutenção da gestação ⁽²⁾.

Nos últimos anos vem se buscando alternativas em termos de protocolos de sincronização de estro para reduzir o período de identificar e sincronizar novamente as fêmeas vazias e permitir que sejam inseridas novamente nos programas reprodutivos. Desta forma, a resincronização de estro em ovinos busca diminuir o período entre inseminações. Miranda et al. ⁽³⁾, sem saber a condição gestacional iniciou outro protocolo com dispositivo de P4, realizando duas inseminações artificiais em um intervalo de 14 dias, com ovelhas da raça Texel no sul do país com efeito da sazonalidade e obtiveram 55,4% de prenhez. Outro trabalho também utilizou dispositivo de progesterona 12 dias após a IA sem saber a condição gestacional e observou que não afetou a gestação do primeiro serviço ⁽⁴⁾.

A utilização do diagnóstico precoce de gestação aos 17 dias é uma possibilidade para identificar precocemente as fêmeas vazias, facilitando a tomada de decisão quanto ao manejo ou mesmo a resincronização das fêmeas para serem submetidas a mais um serviço ⁽⁵⁾.

A associação das duas técnicas, ressinchronização de estro e diagnóstico preditivo de gestação com ultrassonografia Doppler aos 17 dias, tem como objetivo principal diminuir o intervalo entre inseminações e também o estresse causado nas fêmeas, sendo implementada em programas reprodutivos para aumentar a eficiência reprodutiva e reduzir os custos da propriedade. Desta forma, a ressinchronização de estro abre oportunidades para ser incluído em protocolos hormonais de ressinchronização em diferentes categorias de fêmeas, como primíparas e multíparas, alcançando resultados similares entre elas na primeira taxa de serviço ⁽⁶⁾.

A ressinchronização de estro vem sendo utilizada em ovinos associada a inseminação artificial com sêmen a fresco ^(3,4,6). Porém o sêmen ovino criopreservado possui vantagens como utilizar carneiros de alto mérito genético e acelerar o ganho genético do rebanho em um intervalo de tempo muito menor, facilidade de transporte do sêmen e o tempo indeterminado de conservação. Considerando as vantagens do uso de sêmen congelado para programas de melhoramento genético dos animais, o objetivo com o presente trabalho foi avaliar a eficiência do uso de sêmen congelado em duas ou três IATF em protocolos de ressinchronização de estro em ovinos durante uma estação de monta.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira (SCEFS) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen, situada em Brasília, DF, durante os períodos de janeiro a abril, estação reprodutiva. Foram utilizadas 147 ovelhas e dois carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 2 e 5 anos, com escore corporal médio de 2,5 (na escala de 1 a 5, onde 1 significa muito magra e 5 obesa). As ovelhas foram previamente avaliadas quanto ao estado clínico geral, sanitário e reprodutivo. Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob o protocolo CEUA/Cenargen 03/2019.

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

As fêmeas foram separadas aleatoriamente em dois grupos experimentais conforme ilustrado na figura 1. Ambos os grupos, Re-sync (n=72) e Doppler-IA (n=75), foram sincronizados com o protocolo hormonal curto no qual em D-9 foi inserido dispositivo de progesterona (P4) (Primer® Tecnopec, 36 g de progesterona), retirados 7 dias após (D-2) e aplicado 300 UI de eCG (Sincro eCG® Ourofino, 6.000UI de gonadotrofina coriônica equina) e 0,275 mg de cloprostenol sódico (Cioton® JA Saúde Animal, 26,3 mg de cloprostenol sódico). Após a retirada do dispositivo (36 horas, D-1) foi aplicado 25 µg de acetato de buserelina (Sincroforte® Ourofino, 0,042 mg de acetato de buserelina). Cinquenta horas após retirada do dispositivo (D0) foi realizada a inseminação artificial com sêmen congelado por laparoscopia.

No grupo Re-sync os animais passaram por duas IATF num período de 62 dias, iniciando uma nova sincronização de estro aos 23 dias (D23) após a primeira IATF, com colocação do dispositivo de P4 e o diagnóstico de gestação ocorrendo aos 30 dias (D30). A segunda IATF ocorreu em D32, nos animais não gestantes, com realização do diagnóstico de gestação em D62 (Figura 1).

Enquanto no grupo Doppler-IA os animais passaram por três IATF num período de 68 dias, uma nova sincronização iniciou aos 10 dias (D10) após a primeira IATF, aos 17 dias (D17) foi realizado o diagnóstico precoce de não gestação, e as ovelhas com diagnóstico negativo seguiram com o protocolo de sincronização de estro e a segunda inseminação artificial (D19). Dez dias após a segunda IATF (D29) as ovelhas foram submetidas a um novo protocolo de sincronização de estro e diagnóstico de gestação precoce (D36). As fêmeas não gestantes foram submetidas a uma nova IA. Todos os animais tiveram a prenhez confirmada aos 30 dias pós IA (Figura 1).

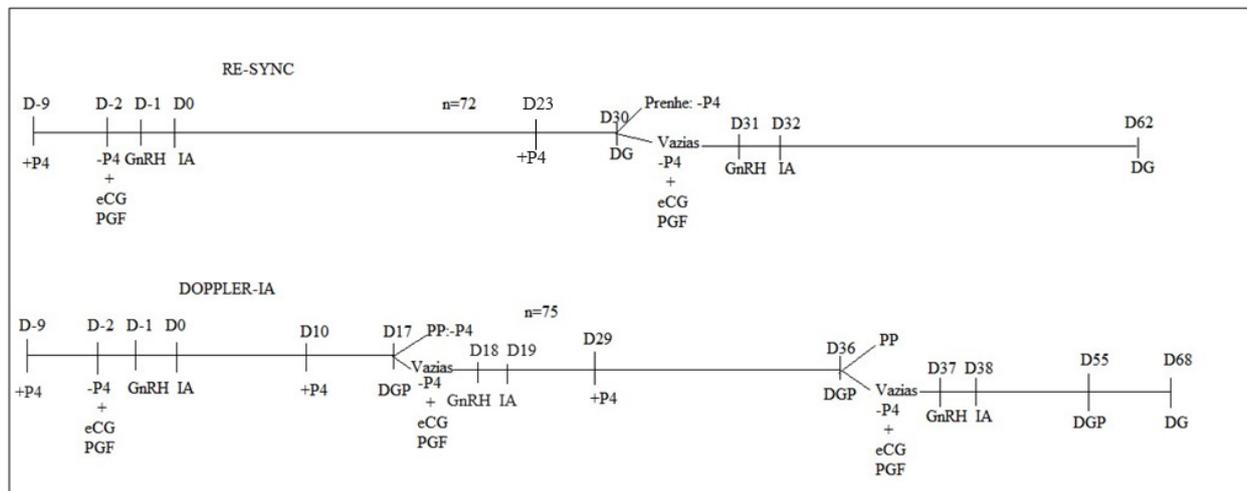


Figura 1 Esquema dos grupos experimentais utilizando um protocolo curto de sincronização/ressincronização de estro: Re-sync com duas inseminações artificiais e Doppler-IA com três inseminações artificiais. Legenda: DG: diagnóstico de gestação; DGP: diagnóstico de gestação precoce; PP: preditivo de prenhez.

Para congelamento de sêmen utilizado nas IATFs foram selecionados dois carneiros após exame clínico geral e andrológico. As coletas de sêmen foram realizadas com auxílio de vagina artificial e todas as partidas do sêmen foram avaliadas a fresco quanto a motilidade espermática, vigor, patologia e concentração espermática, segundo o Manual de Exame Andrológico ⁽⁷⁾. O sêmen foi diluído em meio a base de Tris, ácido cítrico, glicose, gema de ovo e glicerol, segundo Evans e Maxwell ⁽⁸⁾ na concentração de 100×10^6 espermatozoides por palheta de 0,25 ml, acondicionados em cima de um suporte de isopor e congelado pelo método clássico com a curva de resfriamento a $\pm 5^\circ\text{C}$ durante duas horas. Na sequência o sêmen foi exposto a vapor de nitrogênio durante vinte minutos e as palhetas derrubadas para imersão total em nitrogênio para posteriormente serem acondicionadas em raques e armazenadas em botijão de nitrogênio. O sêmen foi descongelado em banho maria a 37°C

durante 30 segundos, e avaliado no descongelamento e no teste de termo resistência após duas horas do descongelamento, no qual permaneceu no banho maria a 37°C. Em ambos os momentos as amostras foram avaliadas para motilidade espermática, motilidade progressiva e velocidade curvilínea (VCL) pelo CASA (Computer Assisted Semen Analyses) e integridade da membrana plasmática, utilizando diacetato 6 carboxifluoresceína e iodeto de propídeo, e integridade do acrossoma utilizando uma conjugação de isotiocianato de fluoresceína com lecitina de amendoim, por microscopia de fluorescência. As partidas foram selecionadas de acordo com os seguintes valores mínimos: motilidade espermática \geq a 70%, motilidade progressiva \geq 40%, VCL (velocidade curvilínea) dos móveis \geq 167, MIAI/MI (membrana íntegra, nas duas técnicas de fluorescência e acrossoma íntegro) \geq 30%.

As inseminações artificiais por laparoscopia ocorreram 50 horas após a retirada dos dispositivos de P4. As ovelhas foram previamente preparadas com jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas. Para as inseminações, as ovelhas foram posicionadas em maca em posição de Trendelenburg, no ângulo de 45° com a cabeça para baixo para facilitar a visualização da cavidade abdominal. Foi realizado tricotomia, antisepsia e anestesia local com cloridrato de lidocaína 2% na área do posicionamento do trocarter para acesso a cavidade abdominal. No lado esquerdo foi inserido a fonte de luz para visualização, e o lado direito para a bainha de IA. A cavidade abdominal foi inflada com auxílio de nebulizador. O sêmen foi descongelado em banho maria a 37°C por 30 segundos, a dose da palheta era fracionada e dividida em duas bainhas de IA, de forma que cada corno uterino recebesse meia dose inseminante. A bainha de IA foi posicionada perpendicularmente à parede uterina na curvatura maior do útero, onde foi inserida a agulha e depositado o sêmen em cada corno uterino, após o procedimento os trocarteres foram retirados e a cavidade abdominal desinflada, sendo realizado o curativo nas incisões.

No grupo Doppler-IA o diagnóstico de gestação precoce ocorreu aos 17 dias após as IA com auxílio de ultrassom equipado com Doppler colorido (MyLabvet 30 VetGold, Esaote, Genova, Italy), utilizando-se probe retal com frequência de 7,5MHz e ganho de 75%. O reto foi lubrificado com mucilagem antes do início das avaliações. Os ovários eram visualizados e o corpo lúteo identificado e avaliado com Doppler, sendo classificado subjetivamente segundo o grau de irrigação: grau 1 (0 a 25% da porcentagem de irrigação do CL), grau 2 (25 a 50%), 3 (50 a 75%) ou 4 (75 a 100% da porcentagem de irrigação do CL). As ovelhas foram consideradas não gestantes quando apresentaram porcentagem de vascularização do CL classificada com grau 1. Os graus 2, 3 e 4 foram consideradas preditivo de prenhez ⁽²⁾. Os graus foram divididos dessa forma para determinar quais porcentagens de irrigações podem prever prenhez aos 17 dias. O diagnóstico de gestação aos 30 dias após as IA, nos dois grupos ocorreu com auxílio de ultrassom modo-B equipado com probe retal, na frequência de 7,5 MHz (Mindary, DP10 Vet Power, China), com base na visualização da vesícula embrionária e batimentos cardíacos.

Foram utilizados os seguintes parâmetros para os valores verdadeiro positivo (VP) fêmeas prenhes nos dois diagnósticos de gestação, verdadeiro negativo (VN) não gestante nos dois diagnósticos de gestação, falso positivo (FP) no diagnóstico precoce de gestação foi

considerado preditivo de prenhes e aos 30 dias estava não gestante e falso negativo (FN) no diagnóstico precoce de gestação foi considerado não gestante e aos 30 dias estava gestante.

Para análise da taxa de prenhez cumulativa foi utilizada o Teste Qui-quadrado. A taxa de gestação do diagnóstico precoce aos 17 dias com ultrassom Doppler foi comparada com a taxa de gestação do diagnóstico confirmatório aos 30 dias com ultrassom modo-B pelo teste de Qui-quadrado. Os graus de irrigação do corpo lúteo foram avaliados no diagnóstico precoce das diferentes inseminações foi testada pelo Teste T student.

3. Resultados

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

Tabela 1 Taxas de prenhez aos 30 dias após a inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado, determinada com ultrassonografia modo-B avaliados em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de ressincronização de estro durante uma estação reprodutiva

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

Letras iguais na mesma linha se assemelham entre si ($P>0,05$).

Tabela 2 Taxa de prenhez do grupo Doppler-IA comparando as avaliações de diagnóstico precoce por ultrassonografia Doppler aos 17 dias, com o diagnóstico por ultrassonografia modo-B aos 30 dias após a inseminação artificial, em ovelhas Santa Inês

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

Letras iguais na mesma linha se assemelham entre si ($P>0,05$).

A frequência dos graus de irrigação do corpo lúteo no diagnóstico precoce de gestação aos 17 dias foi semelhante ($P>0,05$) e está mostrada na Figura 2. Foram congeladas 24 partidas de sêmen, onde somente 12 atingiram os padrões estabelecidos para seleção, os resultados da avaliação das partidas selecionadas são apresentados na tabela 3.

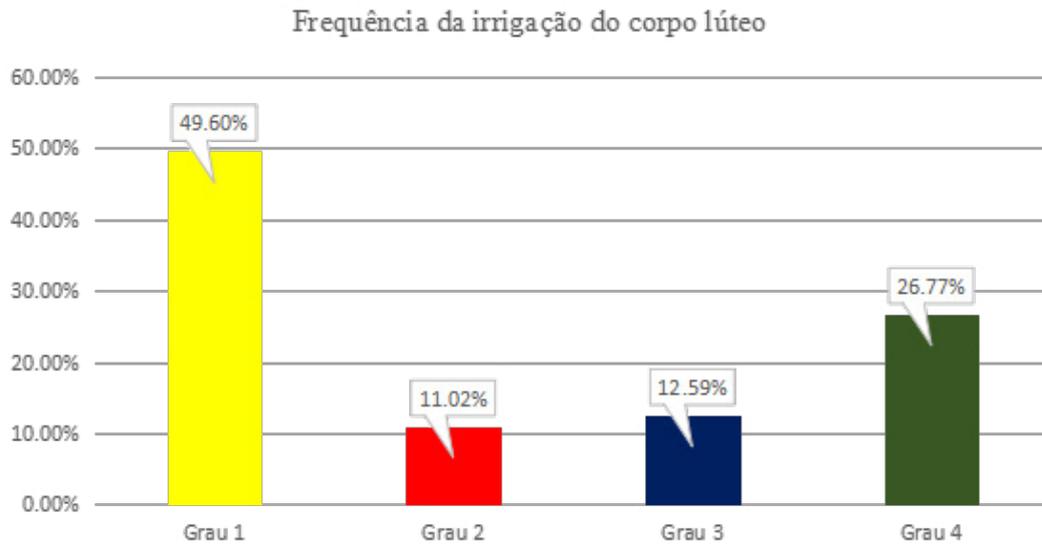


Figura 2 Frequência dos graus de irrigação do corpo lúteo no diagnóstico de gestação precoce utilizando a ultrassonografia Doppler aos 17 dias, no qual o grau 1 (0 a 25% de irrigação) indica o diagnóstico vazio e os graus 2 (26 a 50%), 3 (51 a 75%) e 4 (76 a 100%) indicam preditiva de prenhez, em ovelhas Santa Inês (P>0,05).

Tabela 3 Relação das partidas selecionadas de sêmen congelado dos carneiros que foram utilizadas para a inseminação artificial nos protocolos de sincronização e ressincronização de estro em ovelhas Santa Inês. As partidas foram selecionadas de acordo com os seguintes valores mínimos no TTR 0 horas: motilidade espermática ≥ a 70%, motilidade progressiva ≥40%, VCL ≥167, MIAI/MI ≥ 30%

Partida	TTR 0 h			FLUORESCÊNCIA 0 h						TTR 2 h			FLUORESCÊNCIA 2 h					
	CASA		CFDA	FITC			CASA			CFDA		FITC						
	Mot	Progressiva	VCL	MI	ML	MIAI	MLAR	MLAI	MIAR	Mot	Progressiva	VCL	MI	ML	MIAI	MLAR	MLAI	MIAR
P5	77	45	167	43	57	42	8	49	0	63	21	90	33	66	37	12	51	0
P7	72	45	127	49	51	50	5	44	0	59	35	109	46	53	45	11	41	2
P9	71	52	183	40	60	44	6	50	0	44	33	111	37	62	39	16	42	2,5
P6	77	59	167	45	55	43	2,5	54	0	63	28	104	45	55	50	10	39	0
P14	89,5	61,8	169,82	85	15	80	2	12	6	89,3	63,3	146,5	65	35	58	0	28	14
P16	87,3	76,9	148,76	80	20	75	1	21	3	82,6	52,3	105,8	70	30	60	2	8	30
P17	81,1	63,6	116,24	67	33	57	6	33	4	57,4	29,6	110,2	57	43	47	0	25	28
P19	70,3	61,9	172,43	78	22	83	1	11	5	84,8	70,3	112,4	50	50	43	1	21	35
P20	82,4	51,3	196,98	77	23	67	1	28	4	86,4	52,8	130,5	60	40	55	3	7	35
P21	85,4	52,6	115,65	65	35	55	1	26	18	65,4	22	93,12	60	40	50	11	18	21
P22	86	66,5	140,66	50	50	47	5	35	13	76,3	51	85,53	30	70	35	1	10	50
P23	83,8	62,7	149,36	89	11	82	1	9	8	73,2	35,5	70,05	38	62	39	1	29	31

Legenda: TTR- teste de termoresistência em 0 horas e 2 horas após o descongelamento. P- partida do sêmen que foi congelado. CASA: Computer Assisted Semen Analyses. VCL- velocidade curvilínea dos espermatozoides móveis. CFDA- diacetato 6 carboxifluoresceína e iodeto de propídeo. FITC- uma conjugação de isotiocianato de fluoresceína com lecitina de amendoim. MI- membrana íntegra. ML- membrana lesada. MIAI- membrana íntegra, acrossoma íntegro. MLAR- membrana lesada e acrossoma reagido. MLAI- membrana lesada e acrossoma íntegro. MIAR- membrana íntegra, acrossoma reagido.

4. Discussão

Este trabalho buscou avaliar a eficiência do uso do sêmen congelado na ressincronização de estro com duas ou três sincronizações de estro seguidas de inseminação artificial por laparoscopia em ovinos, utilizando ou não o diagnóstico precoce aos 17 dias com auxílio de ultrassonografia Doppler. A ressincronização de estro em ovinos vem se mostrando uma alternativa para diminuir o intervalo entre inseminações nas fêmeas vazias do primeiro serviço e aumentar a taxa de prenhez ao final da estação de monta, possibilitando o aumento do emprego da inseminação artificial com sêmen congelado. Os trabalhos encontrados na literatura vêm utilizando a ressincronização de estro em ovinos com a inseminação artificial cervical superficial com sêmen fresco alcançando resultados em taxas cumulativas entre 40 e 60% de prenhez ^(3,5).

Os grupos de inseminação artificial com sêmen congelado, no presente trabalho, obtiveram taxa de prenhez cumulativa de 29,16% e 21,33%, respectivamente nos grupos Re-sync e Doppler-IA, abaixo do que se observa em trabalhos utilizando sêmen congelado. Rabassa *et al.* ⁽⁹⁾, obtiveram a taxa de 40% de prenhez em fêmeas Corriedale, enquanto Cardoso ⁽¹⁰⁾ obteve a taxa de 61,7% na IA com sêmen congelado, demonstrando a variação nas taxas de prenhez utilizando sêmen congelado na IATF. Essa variação pode estar associada a diversos fatores que podem interferir nos resultados, tais como: estação do ano, flushing alimentar, condição corporal, fatores estressantes, protocolo hormonal, momento da IA, qualidade do sêmen descongelado e a resposta individual ⁽¹¹⁾. Assim como foi visto no presente trabalho, que obteve taxas de prenhez baixas, pode estar relacionado a interferência do protocolo hormonal utilizado.

Para melhor sincronizar o momento da ovulação e, portanto, otimizar a taxa de prenhez com sêmen congelado das ovelhas no presente trabalho, foi realizada a aplicação de GnRH 30 horas após a retirada do dispositivo de P4. A utilização de GnRH em protocolos de sincronização de estro tem como intuito principal a sincronização da ovulação, que pode ser adiantada em 17 horas em relação aos animais que não receberam GnRH e a ovulação ocorrendo em média 57 horas após a retirada do dispositivo de P4 ⁽¹²⁾. É importante saber o momento da ovulação para determinar o melhor horário da inseminação artificial, no presente trabalho a IA ocorreu as 50 horas após a retirada do dispositivo de P4, sugerindo que o momento da IA ocorreu muito tempo antes da ovulação, possivelmente diminuindo a viabilidade dos espermatozoides no momento da ovulação e consequentemente afetando a taxa de prenhez.

Ainda assim podem ter ocorrido perdas embrionárias no intervalo das avaliações, entre 17 e 30 dias. A ocorrência de perdas embrionárias em ovinos é cerca de 17,2 a 37,7%, podendo variar conforme a quantidade de ovulações e as causas podem ser as mais diversas que afetam a manutenção da gestação após 12 dias da cobertura, podendo chegar até 32 dias ^(13,14). Cosentino *et al.* ⁽⁴⁾, observaram uma taxa de perdas gestacionais de 20% entre 17 e 42 dias em ovelhas que demonstraram estro, foram inseminadas e diagnosticadas precocemente com ultrassonografia Doppler.

No presente trabalho os grupos de ressincronização de estro receberam outro dispositivo de progesterona dez ou vinte e três dias após a inseminação artificial sem saber o status gestacional, assim como realizado em Miranda et al.⁽³⁾, que demonstraram a possibilidade de ressincronização de estro e de outra IA sem alterar a gestação da primeira IA. Desta forma, no presente trabalho, foi realizado nas fêmeas diagnosticadas não gestantes duas ou três inseminações artificiais com a ressincronização de estro iniciando antes mesmo do diagnóstico de gestação. Isso possibilitou a realização das inseminações artificiais dentro do mesmo período, sendo que o grupo Doppler-IA teve a possibilidade de três IA dentro do mesmo período do grupo Re-sync (68 e 62 dias, respectivamente), que teve a possibilidade de duas IA.

O diagnóstico precoce de não-gestação aos 17 dias obteve taxa de prenhez na 1ª IA 46,66%, na 2ª IA 30% e na 3ª IA 18,51%, alcançando uma taxa cumulativa de 69,33%, entretanto ocorreu uma discrepância na taxa cumulativa de gestação quando confirmado o diagnóstico por ultrassonografia aos 30 dias (21,33%), o qual se mostrou inferior à taxa de prenhez esperada. A acurácia do diagnóstico de gestação precoce do presente trabalho foi de 39,8% sendo abaixo da acurácia da técnica demonstrada nos outros trabalhos, cerca de 87%^(5,15). Cosentino et al.⁽⁴⁾, utilizando ressincronização de estro com diagnóstico precoce em ovelhas, obtiveram taxas na primeira IA de 46,7% (28/60) de prenhez, confirmando o diagnóstico aos 42 dias após a IA obtiveram taxa de 58,3% (35/60) de prenhez.

Pode-se observar a incidência de 79% de falsos positivos durante a avaliação da irrigação do CL, no presente trabalho, o que influenciou na acurácia da técnica. Arashiro et al.⁽⁵⁾, encontraram a incidência de falsos positivos em torno de 8 a 16% durante a avaliação da irrigação do CL com ultrassonografia Doppler. O CL em sua fase jovem apresenta maior volume e irrigação entre o 6º e o 13º dia após a ovulação, se ocorrer a luteólise inicia-se a regressão do volume do CL e a diminuição da irrigação a partir do 16º dia⁽¹⁶⁾. A ocorrência de erros de avaliação da porcentagem de irrigação do CL pode ocorrer devido a alterações no ciclo estral, como ciclos estrais mais longos, com o CL no momento da avaliação apresentando boa irrigação. Desta forma sugerindo que os CL durante a avaliação aos 17 dias, no presente trabalho, ao apresentar boa irrigação, possivelmente estavam em sua fase jovem, devido a um ciclo estral longo ou por uma ovulação tardia e não predizendo uma prenhez, corroborando com a hipótese de inadequação do horário da ovulação com o momento da IA.

No presente trabalho, também foi possível observar durante as avaliações da irrigação do CL a alta frequência do grau um, ou seja, baixa irrigação compatível com o CL em luteólise, ao mesmo tempo que não houve diagnóstico falso negativo, sugerindo que não ocorreu erros de interpretação da técnica no diagnóstico precoce de fêmeas vazias. Importante para a utilização do protocolo de ressincronização de estro, já que o animal irá receber hormônios que levariam ao aborto se estivessem prenhes. Arashiro et al.⁽⁵⁾, consideraram que a porcentagem de irrigação do grau um devido à baixa ou ausente irrigação é mais facilmente identificada, entretanto tiveram dificuldade em distinguir os graus 2, 3 e 4 de irrigação do CL. Neste trabalho foi possível identificar as diferentes porcentagens de irrigação do CL caracterizando os quatro graus de avaliação, entretanto não foi observada diferença estatística

na frequência de identificação entre eles, sendo os graus de irrigação do CL 1 e 4 os mais facilmente identificados.

A ressincronização de estro utilizando a IATF por laparoscopia com sêmen congelado é uma técnica que pode ser aplicável em ovinos, entretanto ainda são necessários ajustes nos protocolos de sincronização/ressincronização de estro para obter melhores taxas de prenhez.

5. Conclusão

O uso do sêmen congelado na ressincronização de estro não obteve maior porcentagem de prenhez, mesmo utilizando duas ou três inseminações artificiais, porém com os protocolos utilizados as ovelhas puderam ser inseminadas de duas a três vezes, na mesma duração de uma estação de monta, o que dá oportunidade de uso de animais superiores por meio do sêmen congelado. Ainda são necessários ajustes quanto aos protocolos de sincronização/ressincronização de estro para utilizar o sêmen congelado, visto que a ressincronização de estro em ovinos com sêmen fresco aumenta a porcentagem de fêmeas prenhez. O diagnóstico de gestação precoce em ovinos se mostrou eficiente em diagnosticar as fêmeas efetivamente vazias, podendo dar prosseguimento aos protocolos de ressincronização de estro.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Contribuições do autor

Conceituação: A.F.Ramos e B.D.M. Silva. *Curadoria de dados:* J. Drechmer e L.M.S. Basílio. *Análise formal:* H.C.A. Teixeira e A.F.Ramos. *Aquisição do financiamento:* B.D.M. Silva. *Investigação:* J. Drechmer e L.M.S. Basílio. *Administração do projeto:* J. Drechmer. *Metodologia:* A.F.Ramos e B.D.M. Silva. *Recursos:* A.F.Ramos e B.D.M. Silva. *Supervisão:* A.F.Ramos e B.D.M. Silva. *Visualização:* J. Drechmer. *Redação (Rascunho original):* J. Drechmer. *Redação (revisão e edição):* J. Drechmer e B.D.M. Silva

Referências

1. Moraes, E.P.B.X, et al. Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês. *Ciência Animal Brasileira*. 2008; (1): 148-155. <https://doi.org/10.5216/cab.v9i1.954>
2. Moreira, N.H.; Brasil, O.O.; Silva, J.P.& Ramos, A.F. Utilização de FSH: LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2014; (42). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289029240065>
3. Miranda, V.O., Oliveira, F.C., Dias, J.H., Vargas Júnior, S.F., Goularte, K.L., Sá Filho, M.F., Sá Filho, O.G. D., Baldassarre, H., Vieira, A.D., Lucia, T., Gasperin, B.G. Estrus resynchronization in ewes with unknown pregnancy status. *Theriogenology*. 2018; (106): 103-107. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.019>.
4. Cosentino, I.O.; et al. Hormonal protocols for early resynchronization of ovulation in ewes: The use of progestagens, eCG, and inclusion of early pregnancy diagnosis with color Doppler ultrasound. *Theriogenology*. 2019; (133): 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.033>
5. Arashiro, E.K.N., Ungerfeld, R.; Clariget, R.P.; Pinto, P.H.N; Balaro, M.F.A.; Bragança, G.M.; Ribeiro, L.S.; Fonseca, J.F.; Brandão, F.Z. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology*. 2018; (106): 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.029>
6. Cosentino, I.O.; et al. Fixed timed artificial insemination and early resynchronization of ovulation in diferent categories of ewes in grazing system: Response of multiparous, nulliparous, and lactating ewes during the

breeding season. *Livestock Science*. 2021; (247). <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104461>

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

8. Evans, G.; Maxwell, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Zaragoza: Acribia, 1990. English.

9. Rabassa, V.R; et al. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. *Ciência Animal Brasileira*. 2007; (1): 127-133. <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/1164>

10. Cardoso, E.; et al. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2009; (2): 217-222. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119017351016>

11. Moraes, J.C.F. O emprego da inseminação artificial nas ovelhas. *Embrapa Circular técnica*. 2002; (25). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/228413/o-emprego-da-inseminacao-artificial-nas-ovelhas>

12. Silva, B.D.M.etal. Ovulation induction in ewes using GnRH in long and short-term synchronization protocols. *Animal Reproduction*. 2015; (2): 312-315. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6037f7783717068b462a>

13. Doney, J.M.; Smith, W.F.; Gunn, R.G. Effects of pos-mating environmental stress or administration of ACTH on early embryonic loss in sheep. *J. agric. Sci., Camb*. 1976; (87): 133-136. <https://doi.org/10.1017/S002185960002668X>

14. Diskin, M.G.; Morris, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Dom. Anim*. 2008; (43): 260-267. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>

15. Santos, L.M. et al. Vascularização luteal e diagnóstico de gestação precoce em ovinos. *Comunicado técnico Embrapa*. 2020; (207). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1123299/vascularizacao-luteal-e-diagnostico-de-gestacao-precoce-em-ovinos>

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