

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação de fêmeas ovinas**

**Gabriel Maggi**

Pelotas, 2024

**Gabriel Maggi**

**Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação de fêmeas ovinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Reprodução e Patologia Animal)

Orientador: Bernardo Garziera Gasperin

Coorientadores: Arnaldo Diniz Vieira

Fernando Caetano de Oliveira

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

M193n Maggi, Gabriel

Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação de fêmeas ovinas [recurso eletrônico] / Gabriel Maggi ; Bernardo Garzeira Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, Fernando Caetano de Oliveira, coorientadores. — Pelotas, 2024.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. controle do ciclo estral. 2. inseminação artificial. 3. ovinocultura. 4. gonadotrofina coriônica humana. 5. eficiência reprodutiva. I. Gasperin, Bernardo Garzeira, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Oliveira, Fernando Caetano de, coorient. IV. Título.

CDD 636.30824

Gabriel Maggi

Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação de fêmeas ovinas

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão  
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Ivan Bianchi  
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Dr<sup>a</sup>. Monike Quirino  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Agradecimentos**

Agradeço a meus pais José Otavio e Virginia, por todo apoio e suporte ao longo de toda minha caminhada, além de serem grandes exemplos de pais e profissionais.

A meu irmão Filipe, pela parceria em qualquer situação.

A minha namorada Vitória, que me incentivou e encorajou a ingressar em mais esta etapa, em um momento em que acreditei não ser mais a minha vontade, e por todo seu amor, companheirismo, carinho e cuidado com a nossa família, cada dia mais abençoada após a chegada do nosso Martín.

A Vitória e Cristian, por me acolher em sua casa, sem dúvidas este apoio fez a diferença nesta etapa.

A meu orientador Bernardo, por todos os ensinamentos, orientação e por estar sempre disposto a auxiliar e orientar. Obrigado pela oportunidade!

Aos professores Arnaldo, Rafael, Fernando e Thomaz, que sempre estiveram presentes, sem medir esforços para auxiliar e transmitir conhecimento.

Aos colaboradores do grupo FiBRA, pelo convívio, amizade, ajuda e parceria. Em especial a minhas colegas Fabiane e Jéssica que foram parceiras e estiveram presentes em todas as etapas deste trabalho.

A todas as propriedades parceiras que disponibilizaram seus animais para a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; código de financiamento 001) pela bolsa de mestrado e aos órgãos de fomento CNPq e FAPERGS, sem os quais não seria possível fazer pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária (PPGV-UFPEL), a Faculdade de Veterinária (FaVet-UFPEL) e a Universidade Federal de Pelotas, por toda a estrutura disponibilizada para nosso aperfeiçoamento.

A todos, Muito Obrigado!

## Resumo

MAGGI, Gabriel. **Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação de fêmeas ovinas.** 2024. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

A eficiência reprodutiva dos rebanhos ovinos e a rentabilidade são muito beneficiadas pela utilização de biotécnicas da reprodução assistida, como exemplo dos tratamentos para o controle do ciclo estral e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No primeiro estudo objetivou-se revisar e discutir os principais aspectos dos protocolos para controle do ciclo estral e suas atualizações. Com base nessa revisão, observou-se grande variedade de tratamentos para indução e sincronização do estro, sendo que até o momento os protocolos baseados em progestágenos e gonadotrofina coriônica equina (eCG) são os que possibilitam melhores resultados. O segundo estudo, teve como objetivo revisar a utilização da dupla inseminação artificial (dupla IA), pela via cervical superficial, tanto após a detecção do estro, como em tempo fixo. Observou-se que os resultados apresentados na literatura após a dupla IA são contraditórios. Além disso, a maioria dos estudos não condizem com os protocolos de sincronização do estro e doses inseminantes atuais, além de utilizarem sêmen congelado pela via cervical superficial, a qual não é considerada adequada. Conclui-se que novos estudos são necessários para avaliar o potencial benefício da dupla IATF nos programas de IA utilizados atualmente. Os objetivos do terceiro estudo foram avaliar o efeito da dupla inseminação artificial em tempo fixo, a eficácia da dose de 125 µg de cloprostenol para induzir a luteólise e determinar a curva de disponibilidade de gonadotrofina coriônica humana (hCG) após aplicação por via intramuscular (i.m.). No Exp. 1, ovelhas receberam dispositivos intravaginais (DIV), contendo acetato de medroxiprogesterona (60 mg) durante 7 dias, na remoção do dispositivo foram administrados eCG (300 UI) e prostaglandina (PGF; 250 µg). Todas as ovelhas foram inseminadas 54 h após a retirada do DIV, com utilização de sêmen fresco (100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/dose), pela via cervical superficial, juntamente com a aplicação de 4 µg de buserelina. Nesse momento, as fêmeas foram alocadas em dois grupos: controle (n=127) e 2IA (n=128). O grupo 2IA foi inseminado novamente 14 h após a primeira IATF. No Exp. 2, ovelhas receberam DIV por 6 dias, sendo que na remoção o grupo PGF 125 (n=41) e o grupo PGF 250 (n=40), receberam 125 e 250µg de cloprostenol i.m., respectivamente. Após, as fêmeas foram expostas a monta natural. No Exp. 3, ovelhas (n=5/grupo) foram tratadas com 100 (hCG100), 250 (hCG250) ou 500 UI de hCG i.m. (hCG500), no momento da retirada do DIV, que permaneceu durante 14 dias. Amostras de sangue foram coletadas 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h após a aplicação. No Exp. 1, observou-se que a dupla IATF possibilitou incremento na taxa de prenhez de 12 pontos percentuais, em relação a IA única (P=0,04). No Exp. 2, as doses de 125 e 250 µg de cloprostenol não diferiram quanto a taxas de expressão do estro (81 e 65%, P=0,12), taxa de concepção (67 e 69%, P=0,83) e taxa de prenhez

(54 e 45%,  $P=0,39$ ). No Exp. 3, as três doses de hCG apresentaram pico plasmático 6 h após o tratamento, sendo que foi possível detectar níveis séricos de hCG durante todos os momentos avaliados. Conclui-se que a dupla IATF possibilita incremento significativo na taxa de prenhez, porém, o custo-benefício dessa abordagem deve ser avaliado em cada situação, considerando a necessidade de mão de obra. A eficácia similar das duas doses de cloprostenol avaliadas possibilita a redução de custo e de volume a ser administrado nos animais. Finalmente, as curvas de hCG observadas podem auxiliar na definição de doses a serem utilizadas nos estudos avaliando o potencial uso dessa gonadotrofina para indução do crescimento folicular final ou da ovulação.

**Palavras-chave:** controle do ciclo estral; inseminação artificial; ovinocultura; gonadotrofina coriônica humana; eficiência reprodutiva.

## Abstract

MAGGI, Gabriel. **New approaches to control the estrous cycle and ovulation in sheep**. 2024. 79f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Reproductive efficiency and profitability of sheep flocks are greatly benefited by the use of assisted reproductive biotechnologies, such as estrous cycle control treatments and fixed-time artificial insemination (FTAI). The first study aimed to review and discuss the main aspects of estrous cycle control protocols and their updates. Based on this review, it was observed that there is a great variety of treatments for estrus induction and synchronization, and that protocols based on progestogens and equine chorionic gonadotropin (eCG) currently provide the best results. The second study aimed to review the use of double artificial insemination (double AI) via the superficial cervical route, both after estrus detection and at a fixed time. It was observed that the results presented in the literature after double AI are contradictory. In addition, most studies did not use the estrus synchronization protocols and insemination doses that are currently used, and some studies used frozen semen via the superficial cervical route, which is not considered adequate. It is concluded that further studies are needed to evaluate the potential benefit of double FTAI in current AI programs. The objectives of the third study were to evaluate the effect of double FTAI, the efficacy of the 125 µg dose of cloprostenol to induce luteolysis, and to determine the serum concentration curve of human chorionic gonadotropin (hCG) after intramuscular (i.m.) application. In Exp. 1, ewes received intravaginal device (IVD) containing medroxyprogesterone acetate (60 mg) for 7 days. At device removal, eCG (300 IU) and prostaglandin (PGF; 250 µg) were administered. All ewes were inseminated 54 h after IVD removal with fresh semen via the superficial cervical route, along with 4 µg of buserelin. At this time, the females were allocated to two groups: control (n=127) and 2AI (n=128). The 2AI group was inseminated again 14 h after the first FTAI. In Exp. 2, ewes received IVD for 6 days. At removal, the PGF 125 group (n=41) and the PGF 250 group (n=40) received 125 and 250 µg of cloprostenol i.m., respectively. The females were then exposed to natural mating. In Exp. 3, ewes (n=5/group) were treated with 100 (hCG100), 250 (hCG250) or 500 IU of hCG i.m. (hCG500) at the time of IVD removal, which remained for 14 days. Blood samples were collected 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h after application. In Exp. 1, it was observed that double FTAI allowed 12 percentual points (p.p.) increase in pregnancy rate compared to single FTAI (P=0.04). In Exp. 2, the 125 and 250 µg doses of cloprostenol did not differ regarding the rates of estrus expression (81 and 65%, P=0.12), conception (67 and 69%, P=0.83) and pregnancy (54 and 45%, P=0.39). In Exp. 3, the three doses of hCG induced a serum

concentration peak at 6 h after treatment, and it was possible to detect serum hCG levels at all time-points evaluated. It is concluded that double FTAI allows a significant increase in pregnancy rate, however, the cost-benefit of this approach should be evaluated in each situation, considering the need for additional farm work. The similar efficacy of the two doses of cloprostenol evaluated allows for a reduction in cost and volume to be administered to the animals. Finally, the hCG curves observed can help defining the doses to be used in studies evaluating the potential use of this gonadotropin for induction of final follicular growth or ovulation.

**Keywords:** estrous cycle control; artificial insemination; sheep farming; human chorionic gonadotropin; reproductive efficiency.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Taxas de prenhez de fêmeas ovinas submetidas a única ou dupla IATF, de acordo com as quatro réplicas realizadas no Experimento 1. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ )..... 66
- Figura 2 Taxas de expressão do estro, concepção e prenhez de ovelhas tratadas com 125 ou 250 $\mu$ g de cloprostenol no momento da retirada do dispositivo intravaginal e submetidas à monta natural. Os números no interior das barras indicam a proporção de fêmeas (%) em cada grupo (Exp. 2) ( $P > 0,05$ )..... 67
- Figura 3 Figura 3. Concentração sérica de  $\beta$ -hCG (mUI/mL) 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h após a aplicação de 100, 250 ou 500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por via intramuscular. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em cada momento (Exp. 3)..... 68

## Lista de Tabelas

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Resultados reprodutivos obtidos a partir da realização de inseminação única ou dupla em ovinos a partir da detecção do estro, de acordo com o protocolo hormonal, método de preservação do sêmen, número de espermatozoides na dose inseminante e intervalos de inseminação..... | 43 |
| Tabela 2 | Resultados reprodutivos obtidos a partir da realização de inseminação única ou dupla em tempo fixo em ovinos, de acordo com o protocolo hormonal, método de preservação do sêmen, número de espermatozoides na dose inseminante e intervalos de inseminação.....                 | 45 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|              |   |
|--------------|---|
| $\beta$ -hCG | Subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana |
| CL           | Corpo lúteo                                       |
| DIV          | Dispositivo intravaginal                          |
| ECC          | Escore de condição corporal                       |
| eCG          | Gonadotrofina coriônica equina                    |
| FGA          | Fluorogestona                                     |
| GnRH         | Hormônio liberador de gonadotrofinas              |
| hCG          | Gonadotrofina coriônica humana                    |
| IA           | Inseminação artificial                            |
| IATF         | Inseminação artificial em tempo fixo              |
| LH           | Hormônio luteinizante                             |
| MAP          | Acetato de medroxiprogesterona                    |
| $\mu$ g      | Microgramas                                       |
| $\mu$ L      | Microlitros                                       |
| mg           | Miligramas  |
| MN           | Monta natural                                     |
| P4           | Progesterona                                      |
| P4i          | Progesterona injetável                            |
| PGF          | Prostaglandina F2 $\alpha$                        |
| TETF         | Transferência de embriões em tempo fixo           |
| UFC          | Unidade Formadora de Colônias                     |
| UHT          | Ultra-high temperature                            |
| UI           | Unidade internacional                             |

## Sumário

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução.....</b>           | <b>14</b> |
| <b>2 Objetivos.....</b>            | <b>17</b> |
| <b>3 Artigos.....</b>              | <b>18</b> |
| <b>3.1 Artigo 1.....</b>           | <b>18</b> |
| <b>3.2 Artigo 2.....</b>           | <b>26</b> |
| <b>3.3 Artigo 3.....</b>           | <b>47</b> |
| <b>4 Considerações Finais.....</b> | <b>69</b> |
| <b>Referências.....</b>            | <b>70</b> |
| <b>Anexos.....</b>                 | <b>79</b> |

## 1 Introdução

A ovinocultura é uma importante atividade do setor agropecuário, apresentando importância econômica e social tanto em âmbito nacional (VIANA; WAQUIL, 2020) como em outros países (HAENLEIN, 2001). O rebanho brasileiro é composto por aproximadamente 21,5 milhões de cabeças (IBGE, 2023), apresentando importante crescimento, de aproximadamente 28% na última década. Com a recuperação desta atividade, a busca pela rentabilidade dos rebanhos é uma preocupação dos produtores de ovinos, sendo a eficiência reprodutiva um dos principais fatores que interferem nesta métrica (AMER *et al.*, 1999). Além da rentabilidade, a intensificação dos manejos é uma característica almejada pelos sistemas produtivos modernos (SIMONETTI; LYNCH; CORMICK, 2014), assim, a utilização de biotécnicas da reprodução assistida, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), são consideradas importantes ferramentas para suprir estas demandas.

A IATF está associada com a utilização de tratamentos para o controle do ciclo estral, que apresentam diversas vantagens para os meios produtivos, como a retomada da ciclicidade nos períodos de anestro estacional, a programação dos períodos de acasalamento e concentração dos nascimentos em momentos favoráveis, além de descartar a necessidade de detecção do estro, concentrar os manejos reprodutivos, e maximizar a utilização de carneiros de interesse zootécnico (MENCHACA; RUBIANES, 2004). A realização da sincronização do estro é considerada benéfica e operacionalmente viável em pequenos sistemas produtivos (GIZAW; TEGEGNE, 2018), sendo essa, junto com a IATF, de grande importância para o ganho genético na ovinocultura.

Os protocolos de sincronização do estro mais utilizados comercialmente na ovinocultura envolvem a utilização de dispositivo intravaginal (DIV) contendo progesterona ou seus análogos, associada à administração de uma gonadotrofina, sendo a gonadotrofina coriônica equina (eCG) a mais utilizada. Estes tratamentos apresentam resultados satisfatórios na sincronização do estro (DOGAN; NUR, 2006), porém apresentam taxas de prenhez variáveis (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2001;

LASTER; GLIMP, 1974) dessa forma, há necessidade de estudos que visem o aprimoramento dos protocolos e, conseqüentemente, a melhoria dos índices reprodutivos. A oscilação da taxa de concepção na IATF após os protocolos hormonais pode ser causada por fatores como o momento do pico do hormônio luteinizante (LH). Esse pico pode variar entre os indivíduos, ocasionando, em alguns casos, ovulações tardias (MARTINEZ-ROS; GONZALEZ-BULNES, 2019). O LH é secretado pela adeno-hipófise sob a ação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), dessa forma, o GnRH também pode ser usado como parte do tratamento hormonal na IATF, com o objetivo de induzir o pico pré-ovulatório de LH (RUBIANES *et al.*, 1997) e, conseqüentemente, ovulações síncronas (REYNA *et al.*, 2007). Nesse sentido, estudos realizados e publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a aplicação de GnRH em ovelhas lanadas, no momento da inseminação (54 h após a retirada do DIV), promoveu incremento na taxa de prenhez de aproximadamente 10 pontos percentuais (PEREIRA *et al.*, 2024), representando um avanço recente nos tratamentos para o controle do estro.

Uma alternativa estudada com o objetivo de melhorar os índices reprodutivos é a utilização de uma dupla inseminação, podendo ser realizada após a detecção do estro, ou em tempo fixo (LANGFORD, 1986; SALAMON; LIGHTFOOT, 1970). Esta técnica tem como objetivo disponibilizar maior número de espermatozoides viáveis coincidindo com as ovulações, que ocorrem de forma dispersa (SALAMON; MAXWELL; FIRTH, 1979). Porém, os resultados obtidos com a utilização desta técnica são inconsistentes, em alguns estudos sendo considerada benéfica, e em outros, inviável.

Do mesmo modo que a busca por resultados superiores na utilização das biotécnicas se torna um assunto importante, a redução dos custos destes tratamentos também deve ser discutida. Portanto, a adequação de produtos e redução das dosagens hormonais utilizadas são potenciais aspectos a serem avaliados, visando maior difusão das biotécnicas reprodutivas nos diferentes sistemas de produção da ovinocultura. A prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  e seus análogos são agentes luteolíticos, os quais são frequentemente utilizados na sincronização do estro de ovinos, tanto de forma individual, como associada a protocolos com progestágenos e eCG (ABECIA; FORCADA; GONZÁLEZ-BULNES, 2012). Estes agentes luteolíticos podem ser alvo de estudos para a redução dos custos dos protocolos, visto que há escassez de estudos avaliando a eficácia de doses reduzidas em comparação com as doses

convencionais. Portanto, há necessidade de avaliação dos índices reprodutivos após a utilização de doses reduzidas (BAIRD; SCARAMUZZI, 1975).

Outro fator relevante a ser observado está relacionado com a utilização de eCG nos protocolos hormonais, a qual já está bem estabelecida, sendo associada a melhores taxas de ovulação (MARTINEZ-ROS; RIOS-ABELLAN; GONZALEZ-BULNES, 2019) e incremento nas taxas de concepção (GAROUSSI *et al.*, 2020). Porém, existem indícios de que a utilização de eCG pode levar à redução da fertilidade em ovinos após usos repetidos, devido a ocorrência de uma resposta imunológica (ROY *et al.*, 1999). Além disso, futuramente a comercialização de eCG pode se tornar restrita por preocupações com o bem-estar animal, uma vez que sua produção requer coleta de sangue de éguas prenhes (VILANOVA *et al.*, 2019). Este cenário limitaria os resultados obtidos com os protocolos de indução e sincronização do estro, visto que, comercialmente, a suplementação de gonadotrofinas na espécie ovina é amplamente realizada com eCG (HAMEED *et al.*, 2021). A gonadotrofina coriônica humana (hCG), é uma potencial substituta da eCG, devido a capacidade de se ligar aos receptores de LH, podendo assim ser um importante indutor da ovulação (KINSER *et al.*, 1983). Entretanto, a utilização de hCG como indutor da ovulação foi pouco estudada em ovinos (BRUNO-GALARRAGA *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2018). Também existe a possibilidade da ocorrência de resposta imunológica a hCG, o que deve ser investigado. Além disso, a disponibilidade sérica deste produto após sua aplicação foi pouco estudada na espécie ovina.

Portanto, a investigação de alternativas para o aprimoramento dos protocolos de sincronização e indução do estro, bem como a redução dos custos dos tratamentos hormonais sem comprometer o desempenho reprodutivo, são fundamentais para a maior disseminação das biotécnicas reprodutivas na ovinocultura.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Revisar os tratamentos hormonais e a realização da inseminação artificial dupla em ovinos, bem como avaliar novas abordagens para o controle do ciclo estral e execução da IATF na espécie.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1) Realizar revisão bibliográfica do controle do ciclo estral e da inseminação artificial dupla em ovinos;
- 2) Avaliar a viabilidade da utilização da dupla IATF após protocolo hormonal com progestágeno, eCG, prostaglandina e GnRH;
- 3) Determinar a viabilidade do uso de dose reduzida de cloprostenol sódico para sincronização do estro de ovelhas e seus efeitos sobre a eficiência reprodutiva;
- 4) Avaliar a disponibilidade de  $\beta$ -hCG sérico após administração intramuscular de diferentes doses de hCG.

### **3 Artigos**

#### **3.1 Artigo 1**

##### **Atualizações no controle do ciclo estral em ovinos**

Fernando Caetano de Oliveira, Gabriel Maggi, Julia Nobre Blank Camozzato

Publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal

Volume 47, páginas 129-133, 2023.

DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2023.017

## **Atualizações no controle do ciclo estral em ovinos** *Updates on the control of the estrous cycle in sheep*

**Fernando Caetano de Oliveira<sup>1\*</sup>, Gabriel Maggi<sup>2</sup>, Julia Nobre Blank Camozzato<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. <sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil. \*fcoliveira@ufrgs.br

### **Resumo**

Nos últimos anos, observou-se um aumento no tamanho do rebanho ovino no país, indicando uma retomada na ovinocultura. Para melhorar a eficiência reprodutiva desses animais, a utilização de biotécnicas tem se mostrado uma ferramenta importante. Dentre essas biotécnicas, destacam-se os protocolos de sincronização do ciclo estral, os quais frequentemente utilizam progesterona associada a gonadotrofinas ou análogos da prostaglandina em duas aplicações. Este artigo tem como objetivo revisar os protocolos de sincronização utilizados em ovinos e apresentar atualizações relevantes sobre os mesmos.

**Palavras-chave:** manejo reprodutivo, biotécnicas reprodutivas, sincronização do estro.

### **Abstract**

*In recent years, there has been an increase in the size of the sheep herd in the country, indicating a recovery in sheep farming. To improve the reproductive efficiency of these animals, the use of biotechniques has been shown to be an important tool. Among these biotechniques, estrous cycle synchronization protocols stand out, which frequently use progesterone associated with gonadotropins or prostaglandin analogues in two applications. This article aims to review the synchronization protocols used in sheep and present relevant updates about them.*

**Keywords:** *reproductive management, reproductive biotechniques, estrus synchronization*

### **Introdução**

A ovinocultura brasileira apresenta uma importante retomada produtiva, recentemente atingindo um rebanho de aproximadamente 20,5 milhões de animais (FAO, 2021), representando assim um crescimento de aproximadamente 2,8 milhões de animais em 10 anos (FAO, 2021). A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores responsáveis pelo crescimento dos rebanhos e aumento da rentabilidade dos mesmos (Young et al., 2014). Esta, por sua vez é fortemente favorecida pelo uso de biotécnicas reprodutivas como a utilização de protocolos hormonais para controle do ciclo estral (Gizaw and Tegegne, 2018).

O controle do ciclo estral oferece diversas vantagens para os sistemas produtivos, incluindo a indução da ciclicidade em fêmeas peribúberes e matrizes em anestro estacional, o aumento da taxa ovulatória, a concentração dos manejos reprodutivos e, conseqüentemente, a possibilidade de programação dos períodos de parição para épocas de maior disponibilidade forrageira. Além disso, a concentração do estro e das ovulações torna possível o uso de outras biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) (Gibbons et al., 2019). A utilização dessas técnicas em conjunto com o controle do ciclo estral permite uma difusão mais eficiente de genética de interesse. A partir disso o presente artigo tem como objetivo rever os principais tratamentos para o controle do ciclo estral de fêmeas ovinas.

### **Protocolos a base de progesterona**

A utilização da progesterona (P4) como método para o controle do ciclo estral em fêmeas tem sido objeto de estudo há mais de 70 anos. Um dos primeiros registros foi quando Dutt and Casida, (1948), observaram que aplicações diárias de P4 por um período de 14 dias foram eficazes em desencadear estros férteis após a interrupção da administração do hormônio. Desde então, protocolos baseados em P4 têm sido amplamente utilizados para controlar o ciclo estral em fêmeas ovinas. Esses tratamentos são baseados na endocrinologia da fase lútea do ciclo estral, que permite o controle da secreção do hormônio luteinizante (LH), regulando assim a ovulação e o estro (Hansel and Convey, 1983). Além disso a progesterona pode atuar como indutor da ciclicidade, podendo ser utilizada para retomar a atividade ovarina de fêmeas durante a estação não reprodutiva da espécie através da sensibilização do eixo hipotálamo/hipófise/gonadal (Caraty and Skinner, 1999).

Atualmente, a administração de P4 e seus análogos é realizada por meio de dispositivos intravaginais (DIVs), estes liberam a progesterona de forma lenta, e apresentam a vantagem de serem de fácil uso e permitirem a retirada abrupta da fonte exógena deste hormônio (Abecia et al., 2011). Os DIVs disponíveis comercialmente consistem geralmente em esponjas de poliuretano impregnadas com análogos sintéticos da P4, como o acetato de medroxiprogesterona (MAP) em uma dose de 60 mg ou o acetato de fluorogestona (FGA) em uma dose de 20 a 30 mg. Além disso, há apresentações comerciais de silicone impregnadas com 0,3 ou 0,36 g de progesterona natural.

Os protocolos com o uso de DIVs podem ser classificados conforme o tempo de permanência do dispositivo. Os protocolos de longa duração, consistem na permanência do DIV por um período correspondente ao tempo de vida útil de um corpo lúteo (CL) cíclico (12 a 14 dias) (Gibbons et al., 2019). Estes protocolos são eficientes na sincronização do estro, porém, alguns autores relatam que ao final desses protocolos a liberação de P4 pelo DIV pode ser baixa e inapropriada, levando assim a persistência do folículo dominante (Viñoles et al.,

2001). Já os protocolos de curta duração (5 a 7 dias) são menos duradouros que o CL, sendo assim se faz necessário a aplicação de agentes luteolíticos como a prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF) ou seus análogos sintéticos, garantindo assim a queda de produção de progesterona (Menchaca and Rubianes, 2004). A administração de PGF geralmente é realizada no momento da retirada do dispositivo, porém, pode ser administrada na colocação do DIV.

A utilização dos DIVs contendo os diferentes progestágenos, MAP e FGA, ou progesterona natural, em protocolos de 6 dias não apresentam diferença na taxa de expressão do estro, intervalo entre retirada do dispositivo e início do estro e taxa de concepção em ovelhas expostas a monta natural, na estação não reprodutiva (Ungerfeld and Rubianes, 2002). O mesmo foi observado na utilização destes progestágenos por 14 dias no período de transição reprodutiva da espécie, em animais submetidos a inseminação artificial (Zelege et al., 2005).

O início da expressão do estro após a retirada do DIV ocorre em aproximadamente 48 horas. As ovulações por sua vez se concentram próximo das 60 horas, porém, apresentam uma grande variação podendo ocorrer desde as 48 até as 80 horas após a retirada dos dispositivos (Souza et al., 1995). Os protocolos hormonais contendo P4 podem ser utilizados para indução ou sincronização do estro independente da população ovariana das fêmeas, sendo eficazes na estação reprodutiva ou na contra estação.

A utilização de DIVs é um fator predisponente de vaginite em ovinos, causando acúmulos de secreção mucopurulenta podendo ser sanguinolento em alguns casos (Penna et al., 2013). Estas vaginites levam a aumento na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e alteração na microbiota normal do canal vaginal, a qual é reestabelecida em aproximadamente 48 horas após a retirada dos dispositivos (Vasconcelos et al., 2016). Acredita-se que a causa da vaginite seja de origem física e não hormonal, visto que esponjas não impregnadas também acarretam secreções purulentas (Suárez et al., 2006). Como alternativa para contornar as vaginites e reduzir o descarte de resíduos hormonais e plásticos oriundos dos DIVs, se pode utilizar progesterona injetável de longa ação (P4i), a qual se mostrou eficaz em induzir a puberdade em bovinos, aumentando a taxa de prenhez a IATF de novilhas pré-púberes (de Lima et al., 2020). Porém a utilização desta via de aplicação é pouco estudada em ovinos. D'Avila et al. (2022) mostraram que a utilização da P4i como pré-sincronização de um protocolo convencional de DIV, associado a gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ovelhas em anestro estacional, não foi eficiente em aumentar as taxas de prenhez. Além disso, os mesmos autores observaram que protocolos que substituam DIV por P4i associada a eCG, não foram eficazes na indução e sincronização do estro, porém, foram capazes de induzir algumas ovulações.

A utilização de 20mg de P4i em cabras no período de transição de anestro para o estro, como “P4-priming” associado a diferentes doses de gonadotrofina coriônica humana (hCG - 50, 100 ou 300UI) foi capaz de induzir o

estro e obter prenhez após a monta natural (Alvarado-Espino et al., 2016). A utilização de três aplicações de P4i (25mg) com intervalo de 48 horas, associadas a aplicação única de 250UI de hCG, se mostrou eficiente em induzir o estro e obter fertilidade aceitável (54,5%) em ovelhas em anestro (Dehkordi et al., 2022). De forma geral, os protocolos para controle de ciclo em ovinos que usam as distintas fontes de P4 se mostram eficientes, tanto no controle da supressão do estro como da retirada da P4, viabilizando trabalhos de reprodução durante a contra estação reprodutiva. Para o mercado brasileiro, o elevado custo dos tratamentos em relação ao valor do produto ovino justifica a busca por possibilidades de menor custo em comparação com os dispositivos tradicionais disponíveis.

### **Protocolos a base de prostaglandinas**

Dentre as alternativas hormonais utilizadas para o controle do ciclo estral os protocolos que utilizam análogos da PGF apresentam vantagens por sua fácil aplicação, visto que os mesmos consistem em injeções intramusculares, baixo custo quando comparado aos protocolos baseados em P4, e menor contaminação ambiental (Fierro et al., 2013). Porém, os mesmos apresentam limitações como a aplicação restrita a fêmeas cíclicas, ou seja, que apresentam corpo lúteo, pelo fato de utilizar apenas um agente luteolítico.

Estes tratamentos tradicionalmente consistem em duas aplicações de PGF com um intervalo de 9 a 14 dias, visando assim contornar a refratariedade dos CLs jovens, que ocorre nos dois primeiros dias após a luteinização (Contreras-Solis et al., 2009). Apesar destes protocolos serem eficientes na indução do estro, a mesma ocorre em uma janela de aproximadamente 4 dias, sendo necessário sua identificação, dificultando a utilização na IATF (Loubser and Van Niekerk, 1981). Visando concentrar mais a expressão do estro dos animais tratados com PGF, foi sugerida a redução no intervalo entre aplicações, para 7 dias, com a justificativa que a aplicação deste hormônio no início da fase lútea, enquanto o folículo dominante da primeira onda estivesse em crescimento, reduziria o intervalo de ovulação (Viñoles and Rubianes, 1998). A aplicação deste protocolo resultou na expressão do estro em até 72 horas após a segunda aplicação, apresentando uma maior concentração de cio, entre 25 e 48 horas (Menchaca et al., 2004).

A aplicação deste protocolo na IATF, em três diferentes tempos, sendo estes 42, 48 e 54 horas após a segunda aplicação de PGF, apresentou taxas de prenhez superiores nas ovelhas inseminadas às 42 horas (Menchaca et al., 2004), porém inferiores às taxas de prenhez obtidas em protocolos contendo MAP e eCG (Olivera-Muzante et al., 2011).

### **Utilização de gonadotrofinas e GnRH**

As gonadotrofinas, como as anteriormente citadas, eCG e hCG, assim como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), podem ser associadas aos protocolos de sincronização baseados em P4 ou análogos da PGF, com o objetivo de melhorar a sincronia das ovulações destes tratamentos. A eCG é utilizada para estimular o crescimento e ovulação, visto que este hormônio se liga aos receptores do hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). A aplicação da eCG geralmente ocorre na retirada do DIV (Hashim et al., 2013). Ao comparar protocolos longos com DIV associados ou não a administração de eCG no momento da retirada dos mesmos, Garoussi et al., (2020) observaram significativo aumento nas taxas de concepção dos grupos tratados com esta gonadotrofina. A administração de eCG associada a segunda administração de PGF não foi eficiente em aumentar as taxas de prenhez em ovelhas submetidas IATF, porém, apresentou taxas de prolificidade e fecundidade semelhantes a ovelhas tratadas com DIV+eCG (Cueto et al., 2020).

Ao estudar protocolos baseados em GnRH e análogos da PGF, Rekik et al. (2016) observaram taxas de parição semelhantes às encontradas em protocolos contendo progestagenos e eCG, além de que também não foi possível observar diferença no número de cordeiros obtidos por parto, tornando esse protocolo uma alternativa dentro das estações reprodutivas, visto que o mesmo apresenta menor custo quando comparado a protocolos baseados em progestágenos.

Já Santos-Jimenez et al. (2020) observaram que a utilização de GnRH aplicado 56 horas após a remoção do DIV, ou até mesmo duas aplicações deste hormônio, sendo a primeira no momento da disponibilização do DIV e a segunda também às 56 horas após a remoção do dispositivo foram capazes de induzir o estro da mesma forma que protocolos contendo eCG na estação reprodutiva. Porém, o mesmo não foi observado em períodos de anestro estacional, onde os protocolos com progestágenos + eCG apresentaram maiores taxas de expressão de estro. Resultados semelhantes foram apresentados por Martinez-Ros; Gonzalez-Bulnes, (2019), que também observaram que os protocolos que substituem eCG por duas aplicações de GnRH apresentam maior intervalo entre a retirada do DIV e a ovulação, embora não tenha diferença nas taxas de fertilidade dos animais estudados.

### **Considerações finais**

Os tratamentos revisados são eficientes em induzir o estro e ovulação, porém, os protocolos contendo progesterona e eCG apresentam melhor sincronia do estro em relação às duas aplicações de análogos da PGF, sendo mais eficientes quando utilizados associados a IATF. Além disso, vale ressaltar que a eficiência dos protocolos e suas atualizações dependem da escolha correta para aplicação, sendo influenciados por estação reprodutiva, clima, manejo da propriedade e pela condição corporal dos animais.

### Referências

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 67–79, mar. 2011.
- ALVARADO-ESPINO, A. S.; MEZA-HERRERA, C. A.; CARRILLO, E.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V. H.; GUILLEN-MUÑOZ, J. M.; ÁNGEL-GARCÍA, O.; MELLADO, M.; VÉLIZ-DERAS, F. G. Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. **Animal Reproduction Science**, v. 167, p. 133–138, 1 abr. 2016.
- CARATY, A.; SKINNER, D. C. Progesterone Priming Is Essential for the Full Expression of the Positive Feedback Effect of Estradiol in Inducing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Surge in the Ewe. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 165–170, 1999.
- CONTRERAS-SOLIS, I.; VASQUEZ, B.; DIAZ, T.; LETELIER, C.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 1018–1025, 1 abr. 2009.
- CUETO, M. I.; BRUNO-GALARRAGA, M. M.; FERNANDEZ, J.; FIERRO, S.; GIBBONS, A. E. Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. **Animal Reproduction Science**, v. 221, 1 out. 2020.
- D’AVILA, C. A.; DE MORAES, F. P.; BOHN, A. P.; ROVANI, M. T.; VIEIRA, A. D.; FERREIRA, R.; SALES, J. N. S.; BALDASSARRE, H.; MONDADORI, R. G.; GONÇALVES, P. B. D.; GASPERIN, B. G. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrous ewes. **Livestock Science**, v. 265, 1 nov. 2022.
- DE LIMA, R. S.; MARTINS, T.; LEMES, K. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI. **Theriogenology**, v. 154, p. 128–134, 15 set. 2020.
- DEHKORDI, R. S.; MIRZAEI, A.; BOOSTANI, A. Reproductive efficiency of treated Karakul ewes with short-term progesterone and hCG injections during the non-breeding and breeding seasons. **Animal Reproduction Science**, v. 239, 1 abr. 2022.
- DUTT, R. H.; CASIDA, L. E. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. **Endocrinology**, v. 43, n. 4, p. 208–217, 1948.
- FAO, 2021. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. FAOSTAT AGRICULTURE. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>> Acesso em: 12 mai. 2023.
- FIERRO, S.; GIL, J.; VIÑOLES, C.; OLIVERA-MUZANTE, J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 399–408, fev. 2013.
- GAROUSI, M. T.; MAVADATI, O.; BAHONAR, M.; RAGH, M. J. The effect of medroxyprogesterone acetate with or without eCG on conception rate of fat-tail ewes in out of breeding season. **Tropical Animal Health and Reproduction**, v. 52, p. 1617–1622, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11250-019-02159-8>>.
- GIBBONS, A. E.; FERNANDEZ, J.; BRUNO-GALARRAGA, M. M.; SPINELLI, M. V.; CUETO, M. I. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 803–809, 2019.
- GIZAW, S.; TEGEGNE, A. Bio-economic and operational feasibility of introducing oestrus synchronization and artificial insemination in simulated smallholder sheep breeding programmes. **Animal**, v. 12, n. 7, p. 1517–1526, 1 jul. 2018.
- HANSEL, W.; CONVEY, E. M. Physiology of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. suppl\_2, p. 404–424, 1983.
- HASHIM, N. H.; SYAFNIR; SEMBIRING, M. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. **Biomedical Research**, v. 24, n. 1, p. 7–12, 2013.

- LOUBSER, P. G.; VAN NIEKERK, C. H. Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. **Theriogenology**, v. 15, n. 6, p. 547–552, 1981.
- MARTINEZ-ROS, P.; GONZALEZ-BULNES, A. Efficiency of cidr-based protocols including gnrh instead of ecg for estrus synchronization in sheep. **Animals**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2019.
- MENCHACA, A.; MILLER, V.; GIL, J.; PINCZAK, A.; LACA, M.; RUBIANES, E. Prostaglandin F2a Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 5, p. 352–355, 2004. Disponível em: <www.blackwell-synergy.com>.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 403–413, 2004.
- OLIVERA-MUZANTE, J.; FIERRO, S.; LÓPEZ, V.; GIL, J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1232–1238, 15 abr. 2011.
- PENNA, B.; LIBONATI, H.; DIRECTOR, A.; SARZEDAS, A. C.; MARTINS, G.; BRANDÃO, F. Z.; FONSECA, J.; LILENBAUM, W. Progesterone-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. **Animal Reproduction Science**, v. 142, n. 1–2, p. 71–74, 1 nov. 2013.
- REKIK, M.; HAILE, A.; ABEBE, A.; MULUNEH, D.; GOSHME, S.; BEN SALEM, I.; HILALI, M. E. D.; LASSOUED, N.; CHANYALEW, Y.; RISCHKOWSKY, B. GnRH and prostaglandin-based synchronization protocols as alternatives to progestogen-based treatments in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 6, p. 924–929, 1 dez. 2016.
- SANTOS-JIMENEZ, Z.; MARTINEZ-HERRERO, C.; ENCINAS, T.; MARTINEZ-ROS, P.; GONZALEZ-BULNES, A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, p. 882–884, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anire>.
- SOUZA, C. J. H.; CHAGAS, L. M.; MOURA, A.; MORAES, J. C. F. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 277–281, 1995.
- SUÁREZ, G.; ZUNINO, P.; CAROL, H.; UNGERFELD, R. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 1–2, p. 39–43, maio 2006.
- UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 1, p. 63–66, 2002.
- VASCONCELOS, C. O. de P.; BRANDÃO, F. Z.; MARTINS, G.; PENNA, B.; SOUZA-FABIAN, J. M. G. de; LILENBAUM, W. Análise qualitativa e quantitativa de bactérias da vaginite associadas com implante intravaginal em ovelhas após sincronização de estro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 632–636, 1 abr. 2016.
- VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, p. 993–1004, 2001.
- VIÑOLES, C.; RUBIANES, E. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 429–431, 1998.
- YOUNG, J. M.; TROMPF, J.; THOMPSON, A. N. The critical control points for increasing reproductive performance can be used to inform research priorities. **Animal Production Science**, v. 54, n. 6, p. 645–655, 2014.
- ZELEKE, M.; GREYLING, J. P. C.; SCHWALBACH, L. M. J.; MULLER, T.; ERASMUS, J. A. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, v. 56, n. 1–3, p. 47–53, jan. 2005.

### **3.2 Artigo 2**

#### **Dupla inseminação artificial em ovinos: uma revisão**

Gabriel Maggi, Fabiane Pereira de Moraes, Fernando Caetano de Oliveira, Arnaldo Diniz Vieira, Rafael Gianella Mondadori, Bernardo Garziera Gasperin

Será submetido à revista Animal Reproduction

## Artigo de Revisão

### Dupla inseminação artificial em ovinos: uma revisão

Gabriel Maggi<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0009-0006-2786-824X>), Fabiane Pereira de Moraes<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2502-4108>), Fernando Caetano de Oliveira<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-5191-9901>), Arnaldo Diniz Vieira<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6410-2354>), Rafael Gianella Mondadori<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-0578-8469>), Bernardo Garziera Gasperin<sup>1\*</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-3715-2345>).

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

\*Correspondência: Bernardo Garziera Gasperin, [bggasperin@gmail.com](mailto:bggasperin@gmail.com), Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, s/n - Caixa Postal 354 - Campus Universitário, CEP: 96160-000, Capão do Leão, RS, Brasil.

## RESUMO

A inseminação artificial (IA) em ovinos apresenta resultados variáveis, principalmente quando aplicada em conjunto com tratamentos de indução do estro, no período de anestro da espécie. Neste sentido, alternativas para obtenção de melhores resultados, sem alterar de forma significativa os custos de aplicação da técnica, são essenciais devido à importância desta biotécnica nos sistemas produtivos. Assim, uma alternativa que potencialmente atende estes requisitos é a aplicação da dupla IA. Portanto, a presente revisão tem como objetivo discutir os dados da literatura sobre a aplicação da dupla IA

cervical em ovinos, bem como apontar lacunas no conhecimento existente. Com base na revisão de literatura realizada, observou-se que os resultados obtidos com a dupla IA após detecção de estro ou em tempo fixo (IATF) apresentam taxas de prenhez inconsistentes. Além disso, a maioria dos estudos disponíveis na literatura não condiz com os protocolos de sincronização do estro e doses inseminantes utilizadas atualmente. Adicionalmente, destaca-se que muitos destes estudos utilizaram sêmen congelado realizando a IA pela via cervical superficial. Portanto, novos estudos são necessários para avaliar o potencial benefício da dupla IATF associada a protocolos hormonais e o uso de doses inseminantes condizentes com as práticas atuais.

**Palavras-Chave:** inseminação artificial, ovelhas, inseminação cervical, eficiência reprodutiva.

## 1.INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma importante biotécnica reprodutiva para os sistemas de produção de ruminantes, sendo uma ótima ferramenta para produtores que buscam o melhoramento genético de seus rebanhos (Alvarez et al., 2019). Esta técnica pode estar associada à utilização de tratamentos hormonais, uma abordagem que objetiva o controle do estro e da ovulação, permitindo assim a realização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), ou seja, sem a necessidade de detecção de estro com rufiões (Abecia et al., 2012).

A utilização de biotécnicas associadas traz diversas vantagens como a retomada da ciclicidade durante os períodos de anestro estacional de ovinos e a programação dos períodos de acasalamento e de parição, garantindo melhores condições climáticas e nutricionais para as matrizes e seus produtos. Ainda, é possível aumentar a taxa de

ovulação e, conseqüentemente, o número de nascidos, quando é utilizado tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Menchaca and Rubianes, 2004).

Na ovinocultura a realização da IA apresenta taxas de concepção variáveis, o que está relacionado principalmente à dificuldade de deposição do sêmen no ambiente intrauterino devido à tortuosidade do canal cervical (Fair et al., 2019). Para realizar a deposição intrauterina do sêmen é necessária a realização da inseminação laparoscópica, sendo essa uma técnica de custo elevado e, geralmente, restrita à utilização de sêmen congelado de alto valor (Alvarez et al., 2019). Na ovinocultura comercial, a principal abordagem de inseminação é a cervical, na qual o sêmen percorre todo o canal cervical para poder alcançar o lúmen uterino. Essa forma é indicada somente para IA com sêmen fresco ou resfriado, podendo ser realizada após detecção de estro ou em tempo fixo (Gibbons et al., 2019).

Embora a IA cervical seja um procedimento simples, rápido e de baixo custo, os resultados obtidos podem variar muito. Fatores como deficiências nutricionais, baixo escore de condição corporal, baixa qualidade do sêmen e manejo deficiente podem comprometer os resultados. Ainda, protocolos hormonais inadequados e dispersão no momento das ovulações também podem afetar negativamente as taxas de concepção (Abecia et al., 2012; Gibbons et al., 2019).

Uma alternativa para incrementar as taxas de prenhez obtidas com a IA cervical superficial é a realização de dupla inseminação, depositando duas doses de sêmen no trato reprodutivo da fêmea em curto espaço de tempo. Porém, os estudos presentes na literatura são antigos, utilizando metodologias distintas e tratamentos hormonais não comumente utilizados na atualidade, além de reportarem taxas de prenhez bastante inconsistentes. Portanto, a presente revisão tem como objetivo relatar e discutir os dados presentes na

literatura sobre a aplicação da dupla IA cervical em ovinos, identificando lacunas no conhecimento existente acerca desta prática.

## **2. DUPLA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

A dupla inseminação em ovinos pode ser realizada após a identificação de estro ou após tratamentos para a sincronização do estro e ovulação à base de progestágenos e análogos da prostaglandina F2 alfa (PGF). Além disso, as IA podem ser realizadas em diferentes intervalos. Tais variações podem levar a diferentes resultados na eficiência reprodutiva após a realização da técnica, portanto, serão abordadas em detalhes nesta revisão.

### **2.1 Dupla inseminação após detecção de estro**

Existem relatos da utilização da dupla IA desde o início da década de 1970 (Tabela 1), quando Salamon and Lightfoot, (1970) observaram incremento de aproximadamente 16 p.p. (22,6 vs. 38,8%) e 13 p.p. (39,7 e 53%) nas médias das taxas de parto de ovelhas submetidas a dupla IA cervical superficial e cervical profunda, comparadas a ovelhas submetidas a inseminação cervical única, após a detecção do estro. No referido estudo, o intervalo das inseminações foi de aproximadamente 12 horas com utilização de sêmen congelado.

Em um estudo semelhante, Salamon (1971) observou que a taxa de parição em ovelhas submetidas a duas IA com intervalo de 10 horas, após a detecção do segundo estro, decorrente de uma sincronização prévia com dispositivos intravaginais (DIV) com progestágenos, foi maior, independentemente do uso de sêmen fresco ou congelado. Visser and Salamon (1973) observaram resultados contraditórios em dois experimentos realizados. Em um experimento observaram acréscimo na taxa de parto de ovelhas

submetidas à dupla IA (com intervalo de 8 horas entre as IAs), porém, em outro experimento, onde compararam a utilização de sêmen com diferentes concentrações, associados ou não a dupla IA, apresentaram prenhez semelhantes entre a inseminação única e a dupla IA.

Visser and Salamon (1974) apresentaram a hipótese de que os benefícios da dupla inseminação estavam ligados ao maior número de espermatozoides depositados no trato reprodutivo das fêmeas, pois observaram que uma única inseminação com maior número de espermatozoides na dose inseminante também levava ao aumento nas taxas de parição. Ao usar doses inseminantes contendo mesmo número total de células tanto para única IA como para a dupla IA ( $180 \times 10^6$  ou  $90 + 90 \times 10^6$  espermatozoides móveis), Salamon (1977) não observou diferença nas taxas de prenhez, sugerindo que incremento nos índices reprodutivos observados pelos demais estudos estariam relacionados com maior número de células espermáticas depositado. Jha et al. (2020), realizando a detecção do estro após protocolo de sincronização utilizando duas doses de análogo da PGF, também não observaram diferenças nas taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com inseminação única ou dupla IA, com intervalo de 6 horas. As IAs foram realizadas pela via cervical, utilizando o mesmo número total de espermatozoides móveis ( $200 \times 10^6$ , no estudo 1; e  $100 \times 10^6$ , no estudo 2). Ressalta-se que o estudo utilizou baixo número amostral de animais.

Outras hipóteses foram sugeridas para explicar a obtenção de incrementos nas taxas de prenhez. Salamon et al. (1979) sugeriram que a deposição do sêmen 12-14 horas após a detecção do estro estaria expondo o espermatozoide a envelhecimento adicional no trato reprodutivo feminino. Por sua vez, a segunda inseminação ocorreria de forma mais síncrona com o momento da ovulação, tendo assim um envelhecimento reduzido.

Simonetti et al. (2002) utilizando sincronização do estro a base de progesterona e eCG seguido da detecção de estro, não observaram diferença nas taxas de parição entre ovelhas inseminadas uma vez (7 a 11 horas após detecção do estro) e ovelhas que receberam dupla inseminação (3 a 4 horas após a detecção do estro e 8 a 9 horas após a primeira inseminação). Resultados semelhantes foram observados por Muñoz et al. (2002), ao testarem intervalos entre inseminações de 3 e 6 horas, porém, sem a utilização de eCG na retirada dos dispositivos e subsequente detecção do estro. Paulenz et al. (2003) observaram maior taxa de não retorno ao estro, porém sem diferenças na taxa de parição, em ovelhas inseminadas duas vezes com intervalo de 24 horas, sendo a primeira IA realizada de 12 a 24 horas após a detecção do estro.

A inseminação dupla também poderia ser uma alternativa para sistemas de criação orgânicos, em que há maior dificuldade no controle do ciclo estral e de utilização de técnicas para incremento das taxas de prenhez. Palacios et al. (2022) utilizando ovelhas em estro natural, realizaram inseminação cervical com sêmen fresco em três diferentes momentos, sendo eles: antes de 5; 5 a 16; e entre 16 e 24 horas após a detecção do estro. Os animais foram inseminados pela segunda vez 24 horas após a primeira IA, não sendo observado acréscimo nas taxas de prenhez em nenhum dos grupos estudados.

Vale ressaltar que a intensificação da ovinocultura e a procura por redução no número de manejos dos rebanhos, além da necessidade de manutenção de rufiões na propriedade, tornam os manejos de detecção de estro um limitante para aplicação da IA. Assim, estudos buscando aprimorar protocolos de sincronização do estro e ovulação tornam-se essenciais para a disseminação das demais biotécnicas. A utilização da dupla IATF poderia representar uma alternativa para ovelhas sincronizadas, por não exigir o manejo de detecção de estro, e reduzir a quantidade de manejos de coleta de sêmen e

inseminação, além de ser uma alternativa de baixo custo para incremento na eficiência reprodutiva dos rebanhos.

## **2.2 Dupla inseminação em tempo fixo**

O sucesso de um protocolo de IATF depende principalmente do adequado controle do momento da ovulação e da IA. Portanto, parece lógico que a realização de duas IATF pode trazer benefícios por aumentar a chance de fecundação. Em estudo utilizando ovelhas sincronizadas com duas aplicações de análogos de PGF e dupla IATF, 56 e 66 h após a segunda aplicação de PGF, obteve-se maiores taxas de prenhez comparada com IA única em 60 ou 66 h, porém, não houve benefício em relação às IAs realizadas às 56 h (Tabela 2; Acritopoulou-Fourcroy et al., 1982). Já Hackett et al. (1981) não observaram vantagem na utilização da dupla IA, após a utilização de tratamentos com duas aplicações de PGF. Resultados semelhantes foram observados por Ismaya and Soetimboel (1995) em ovelhas inseminadas em tempo fixo 48 h após a segunda aplicação de PGF, tendo a segunda inseminação realizada em um intervalo de 24 horas.

Ainda com protocolos que envolvem a administração de duas doses de prostaglandina, com intervalo de 15 dias, associadas a IATF ou dupla IATF, Burutaran et al. (2024), utilizando sêmen fresco (dose inseminante com  $150 \times 10^6$  espermatozoides móveis), não observaram vantagens na utilização da dupla IATF realizada num intervalo de 24 horas (44 e 68h após a segunda aplicação de PGF), quando comparada à inseminação única 44, 54 ou 68 horas após a aplicação da segunda dose de PGF. É importante ressaltar que a utilização de protocolos baseados apenas no tratamento com PGF não seria a melhor recomendação para a realização de IATF, uma vez que há controle apenas da fase luteal do ciclo estral, não havendo controle do crescimento

folicular, acarretando em maior dispersão do momento das ovulações em comparação aos protocolos que utilizam progestágenos associados a eCG.

A aplicação da dupla IA associada a protocolos de longa duração (12-14 dias) à base de progestagenos, com ou sem a adição de eCG (500 UI), utilizando sêmen refrigerado com dose inseminante de  $450 \times 10^6$  espermatozoides móveis, não apresentou incremento significativo nas taxas de parição. Os intervalos entre as duas IAs foram de 4, 5 ou 6 horas (Langford, 1986, 1982; Langford et al., 1983, 1982). Cabe ressaltar que os referidos estudos utilizaram dose inseminante com número total de células quatro vezes superior ao número convencionalmente utilizado e, portanto, os eventuais benefícios de duas IATF podem ter sido mascarados. Após a aplicação de protocolo baseado em progesterona (14 dias) associada à eCG (600 UI), Curnock et al. (1984) concluíram que a utilização de dupla IA é necessária para obtenção de taxas de concepção aceitáveis quando utiliza-se sêmen congelado. Em metodologia semelhante, porém com utilização de sêmen fresco e doses inseminantes com menor número de células ( $150 \times 10^6$  espermatozoides móveis), Simonetti et al. (2014) encontraram desempenho reprodutivo superior, porém, o reduzido número amostral ( $n=24$ ) limita as conclusões.

Ao utilizar protocolos com DIVs de MAP ou progesterona durante 9 dias, associados à eCG (600 UI) utilizando sêmen fresco ( $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis), Fukui et al. (1991) observaram que a utilização de inseminação única é tão eficiente quanto à utilização da dupla IA, com intervalo de 12 horas. Novamente, o elevado número de células utilizados na IA não condiz com as práticas atuais.

Ao associar a dupla inseminação com protocolos de curta duração de P4, com PGF na inserção do dispositivo e eCG (250 UI) na retirada do mesmo, Menchaca et al. (2005) não observaram acréscimo nas taxas de prenhez aos 35 dias, utilizando um

intervalo de 6 horas entre as inseminações (48 e 54 horas após a retirada do dispositivo), com a utilização de sêmen resfriado e dose inseminante de  $200 \times 10^6$  espermatozoides. Ressalta-se que as taxas de prenhez no referido estudo foram baixas, oscilando entre 10 e 35%, independente do tratamento, o que sugere que outras variáveis podem ter interferido nos resultados. Alguns autores ainda relatam menores taxas de prenhez em ovelhas submetidas a dupla IA em tempo fixo (dupla IATF), atribuindo esse resultado a um possível impacto do estresse causado pelo manejo adicional (Smith et al., 1978).

Ao nosso conhecimento, nenhum dos estudos disponíveis na literatura utilizou indutor de ovulação como hCG ou GnRH. Portanto, é possível que o uso adicional dos referidos indutores possa aumentar a chance de fecundação após realização de uma ou duas IATF. Entretanto, essa hipótese ainda necessita ser testada.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos após a aplicação da dupla inseminação artificial após detecção de estro, ou em tempo fixo, ainda são contraditórios. A maioria dos estudos avaliaram protocolos de sincronização do estro e doses inseminantes diferentes dos utilizados atualmente. Os estudos, em sua maioria, utilizaram sêmen congelado pela via cervical superficial, a qual não é considerada adequada devido à baixa viabilidade espermática. Portanto, ainda há oportunidade para a realização de novos estudos que permitam avaliar o potencial benefício da dupla IATF considerando os protocolos hormonais e as condutas de IA condizentes com as práticas atuais.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES (Financial code 001), CNPq (Pq 310932/2021-1; e Projeto INCT 406866/2022-8) e FAPERGS (grant RITEs-RS, 22/2551-0000391-5).

## REFERÊNCIAS

- Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2012;130:173–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>.
- Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 2011;27:67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.001>.
- Abril-Parreño L, Krogenæs AK, Byrne CJ, Donovan A, Stuen S, Caldas E, et al. Ewe breed differences in cervical anatomy and cervicovaginal mucus properties: An international study. *Theriogenology* 2021;160:18–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.038>.
- Acritopoulou-Fourcroy S, Pappas V, Peclaris G, Zervas N, Skoufis V. Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2alpha or the prostaglandin analogue, ICI 80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nutr Dev* 1982;22:345–54.
- Alvarado-Espino AS, Meza-Herrera CA, Carrillo E, González-Álvarez VH, Guillen-Muñoz JM, Ángel-García O, et al. Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. *Anim Reprod Sci* 2016;167:133–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.019>.
- Alvarez M, Anel-Lopez L, Boixo JC, Chamorro C, Neila-Montero M, Montes-Garrido R, et al. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals* 2019;54:32–40.
- Amer PR, Mcewan JC, Dodds KG, Davis GH. Economic values for ewe prolificacy and lamb survival in New Zealand sheep. *Livest Prod Sci* 1999;58:75–90.
- Baird DT, Scaramuzzi RJ. Prostaglandin F2 $\alpha$  and luteal regression in the ewe: comparison with 16 aryloxyprostaglandin (I. C. I. 80, 996). *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1975;15:161–74.
- Bruno-Galarraga M, Cano-Moreno V, Lago-Cruz B, Encinas T, Gonzalez-Bulnes A, Martinez-Ros P. The use of hcg for inducing ovulation in sheep estrus synchronization impairs ovulatory follicle growth and fertility. *Animals* 2021;11.  
<https://doi.org/10.3390/ani11040984>.
- Burutaran M, Fierro S, Negrín F, Minteguiaga M, Gil J, Olivera–Muzante J. Estrous, ovulation and reproductive responses of ewes synchronized with a long interval prostaglandin–based protocol for timed AI. *Theriogenology* 2024;214:187–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.027>.
- Caraty A, Skinner DC. Progesterone Priming Is Essential for the Full Expression of the Positive Feedback Effect of Estradiol in Inducing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Surge in the Ewe. *Endocrinology* 1999;140:165–70.

- Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, Lopez-Sebastian A, Gonzalez-Bulnes A. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect.” *Theriogenology* 2009;71:1018–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.004>.
- Cueto MI, Bruno-Galarraga MM, Fernandez J, Fierro S, Gibbons AE. Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. *Anim Reprod Sci* 2020;221. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106597>.
- Curnock RM, Reed HCB, Logue DN, Maxwell WMC. Artificial Insemination of Ewes with Ram Semen Frozen by the Pellet Method. *Proceedings of the British Society of Animal Production* (1972) 1984;1984:100–100. <https://doi.org/10.1017/s0308229600014562>.
- D’Avila CA, de Moraes FP, Bohn AP, Rovani MT, Vieira AD, Ferreira R, et al. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrous ewes. *Livest Sci* 2022;265. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105070>.
- Dehkordi RS, Mirzaei A, Boostani A. Reproductive efficiency of treated Karakul ewes with short-term progesterone and hCG injections during the non-breeding and breeding seasons. *Anim Reprod Sci* 2022;239. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106969>.
- Dias JH, Gonçalves JD, Arrais AM, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG, Bastos R, et al. Single dose of 300 IU hCG in the early luteal phase in superovulated ewes: Effects on corpora lutea, progesterone profile, and embryo recovery. *Anim Reprod Sci* 2022;247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107101>.
- Dias LMK, Sales JNS, Viau P, Barros MBP, Nicolau SS, Simões LMS, et al. Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2018;70:122–30. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9679>.
- Dutt RH, Casida LE. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology* 1948;43:208–17.
- Fair S, Meade KG, Reynaud K, Druart X, De Graaf SP. The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix. *Reproduction* 2019;158:1–13. <https://doi.org/10.1530/REP>.
- Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Soto AT, de la Sota RL, Cueto MI, Lacau-Mengido IM, et al. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. *Theriogenology* 2019;126:63–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.008>.
- Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 2013;79:399–408. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.022>.
- Fukui Y, Yamamoto Y, Goda S, Ono H. Single or Double Inseminations at Fixed-Time Basis on Lambing Rate of Ewes Treated with Progesterone-Impregnated Intravaginal

Sponges during the Non-Breeding Season. *Japanese Journal of Animal Reproduction* 1991;37:231–5.

Garoussi MT, Mavadati O, Bahonar M, Ragh MJ. The effect of medroxyprogesterone acetate with or without eCG on conception rate of fat-tail ewes in out of breeding season. *Tropical Animal Health and Reproduction* 2020;52:1617–22. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02159-8>/Published.

Gibbons AE, Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Spinelli MV, Cueto MI. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Anim Reprod* 2019;16:803–9. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>.

Gizaw S, Tegegne A. Bio-economic and operational feasibility of introducing oestrus synchronization and artificial insemination in simulated smallholder sheep breeding programmes. *Animal* 2018;12:1517–26. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003032>.

Hackett AJ, Langford GA, Robertson HA. Fertility Of Ewes After Synchronization Of Estrus With Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  And Artificial Insemination. *Theriogenology* 1981;15:599–603.

Haenlein GFW. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci* 2001;84:2097–115. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74655-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74655-3).

Hansel W, Convey EM. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 1983;57:404–24.

Haresign W, Acritopoulou SA. Controlled breeding in sheep using the prostaglandin analogue, ICI 80996. *Livest Prod Sci* 1978;5:313–9.

Hashim NH, Syafnir, Sembiring M. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. *Biomedical Research* 2013;24:7–12.

Ismaya, Soetimboel M. Effects of Breed of Sire and Double Insemination on Performance of Reproduction of Local Sheep. *Bulletin of Animal Science* 1995:263–6.

Jha PK, Alam MdGS, Mansur MdA Al, Talukder MRI, Naher N, Rahman AKMA, et al. Effects of number of frozen-thawed ram sperm and number of inseminations on fertility in synchronized ewes under field condition. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology* 2020;35:190–7. <https://doi.org/10.12750/jarb.35.2.190>.

Kinser AR, Gibson MF, Vince DL, Scheffrahn NS, Keslera' F DJ. Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone, PMS, hCG and(or) GnRH. *Theriogenology* 1983;19:449–64.

Kittok RJ, Stellflug JN, Lowry SR. Enhanced progesterone and pregnancy rate after gonadotropin administration in lactating ewes 1. *Journal of Animal Science* 1983;56:652–5.

Langford GA. Influence of body weight and number of Inseminations on fertility of progestogen-treated ewe lambs raised in controlled environments. *J Anim Sci* 1986;62:1058–62.

- Langford GA. Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progestogen-treated sheep in confinement. *J Anim Sci* 1982;54:1205–11.
- Langford GA, Ainsworth L, Wolynetz MS. Reproductive response of progestatogen-treated sheep in confinement to a single and double insemination. *J Anim Sci* 1982;54:12–7.
- Langford GA, Marcus GJ, Batra TR. Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogen-treated sheep. *J Anim Sci* 1983;57:307–12.
- Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994;369:455–61.
- de Lima RS, Martins T, Lemes KM, Binelli M, Madureira EH. Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI. *Theriogenology* 2020;154:128–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.036>.
- Loubser PG, Van Niekerk CH. Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology* 1981;15:547–52.
- Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Efficiency of cidr-based protocols including gnrh instead of ecg for estrus synchronization in sheep. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9040146>.
- Martinez-Ros P, Rios-Abellan A, Gonzalez-Bulnes A. Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrus behavior, ovulatory success and fertility in sheep. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9010009>.
- Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E. Prostaglandin F2a Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. *Reproduction in Domestic Animals* 2004;39:352–5.
- Menchaca A, Pinczak A, Queirolo D. Storage of ram semen at 5 °C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim Reprod* 2005;2:195–8.
- Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:403–13. <https://doi.org/10.1071/RD04037>.
- Muñoz CM, Parraguez G VH, Latorre E V. Efecto del tiempo de inseminación artificial después de la detección de celo sobre la tasa de preñez en ovinos corriedale. *Agricultura Técnica* 2002;62:613–23.
- Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013;96:2873–82. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5895>.

- Oliveira MEF, Barlewski PM, Feliciano MAR. Controle do Ciclo estral . In: Oliveira MEF, Teixeira PPM, Vicente WRR, editors. *Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos*. 1st ed., São Paulo: Editora Med Vet; 2013, p. 71–90.
- Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 2011;75:1232–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.036>.
- Palacios C, Abecia JA, Plaza J, Hidalgo C, de la Fuente LF. Efficiency of Artificial Insemination at Natural Estrus in Organic Churra Ewes. *Vet Sci* 2022;9:370. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070370>.
- Paulenz H, Söderquist L, Ådnøy T, Fossen OH, Berg KA. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology* 2003;60:759–66. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00048-7).
- Penna B, Libonati H, Director A, Sarzedas AC, Martins G, Brandão FZ, et al. Progestin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. *Anim Reprod Sci* 2013;142:71–4. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.006>.
- Pereira RG, Pires OS, Hoefle CA, Fritzen A, Fiordalisi G, Ferst JG, et al. GnRH analogs induce a LH peak and increase pregnancy per timed-AI in ewes. *Theriogenology* 2024;215:132–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.003>.
- Re G, Badino P, Novelli A, Vallisnerit A, Girardi C, Ozzano Emilia P, et al. Specific binding of d-cloprostenol and d-cloprostenol to PG F<sub>2</sub> receptors in bovine corpus luteum and myometrial cell membranes. *J Vet Pharmacol Therap* 1994;17:455–8.
- Rekik M, Haile A, Abebe A, Muluneh D, Goshme S, Ben Salem I, et al. GnRH and prostaglandin-based synchronization protocols as alternatives to progestogen-based treatments in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 2016;51:924–9. <https://doi.org/10.1111/rda.12761>.
- Roy F, Combes B, Vaiman D, Cribiu EP, Pobel T, Delétang F, et al. Humoral Immune Response to Equine Chorionic Gonadotropin in Ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and Interference with Subsequent Fertility. *Biology of Reproduction* 1999;61:209–18.
- Salamon S. Fertility following Deposition of Equal Numbers of Frozen-thawed Ram Spermatazoa by Single and Double Insemination. *Aust J Agric Res* 1977;28:477–9.
- Salamon S. FERTILITY OF RAM Spermatazoa Following Pellet Freezing On Dry Ice at -79 and -140°C\*. *Aust J Biol Sci* 1971;24:183–5.
- Salamon S, Lightfoot RJ. Fertility of ram spermatazoa frozen by the pellet method III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *J Reprod Fertil* 1970;22:409–23.

- Salamon S, Maxwell W, Firth J. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Anim Reprod Sci* 1979;2:373–85.
- Saleh M, Shahin M, Wuttke W, Gaulty M, Holtz W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). *Reproduction* 2012;144:77–81. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0093>.
- Santos-Jimenez Z, Martinez-Herrero C, Encinas T, Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals* 2020;55:882–4. <https://doi.org/10.1016/j.anire>.
- Simonetti L, Lynch GM, Cormick MM. Fixed-time artificial insemination in dairy ewes raised in field conditions in Argentina. *Acta Veterinaria Brasilica* 2014;54–9.
- Simonetti L, Ramos G, Gardón JC. Effect of estrus synchronization and artificial insemination on reproductive performance of Merino sheep Efeitos da sincronização do estro e da inseminação artificial sobre a performance reprodutiva de ovelhas Merino. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2002;39:143–6.
- Smith PA, Boland MP, Gordon I. Conception rate in ewes: effect of method of breeding and number of inseminations. *J Agric Sci, Camb* 1978;91:511–2.
- Souza CJH, Chagas LM, Moura A, Moraes JCF. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. *Ciência Rural* 1995;25:277–81.
- Suárez G, Zunino P, Carol H, Ungerfeld R. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 2006;63:39–43. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.01.011>.
- Teixeira TA, da Fonseca JF, de Souza-Fabjan JMG, de Rezende Carvalheira L, de Moura Fernandes DA, Brandão FZ. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. *Trop Anim Health Prod* 2016;48:545–51. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0989-y>.
- Ungerfeld R, Rubianes E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 2002;46:63–6.
- Vasconcelos CO de P, Brandão FZ, Martins G, Penna B, Souza-Fabjan JMG de, Lilenbaum W. Análise qualitativa e quantitativa de bactérias da vaginite associadas com implante intravaginal em ovelhas após sincronização de estro. *Ciencia Rural* 2016;46:632–6. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150365>.
- Vilanova XM, De Briyne N, Beaver B, Turner P V. Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9121053>.

Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 2001;55:993–1004.

Viñoles C, Rubianes E. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 1998;78:429–31. <https://doi.org/10.4141/A98-015>.

Visser D, Salamon S. Fertility following Inseminations with Frozen-Thawed Reconcentrated and Unconcentrated Ram Semen. *Aust J Biol Sci* 1974;27:423–5.

Visser D, Salamon S. Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris-based diluent\*. *Aust J Biol Sci* 1973;26:513–6.

Young JM, Trompf J, Thompson AN. The critical control points for increasing reproductive performance can be used to inform research priorities. *Anim Prod Sci* 2014;54:645–55. <https://doi.org/10.1071/AN13269>.

Zelege M, Greyling JPC, Schwalbach LMJ, Muller T, Erasmus JA. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research* 2005;56:47–53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.12.006>.

Tabela 1. Resultados reprodutivos obtidos a partir da realização de inseminação única ou dupla em ovinos a partir da detecção do estro, de acordo com o protocolo hormonal, método de preservação do sêmen, número de espermatozoides na dose inseminante e intervalos de inseminação.

| Autor                             | Tratamento Hormonal      | Sêmen | Dose Ins. (x10 <sup>6</sup> ) | Dupla IA (h) |         |         | Results Obtained (%) |                   |                   | ≠ (p.p) | Valor de P |
|-----------------------------------|--------------------------|-------|-------------------------------|--------------|---------|---------|----------------------|-------------------|-------------------|---------|------------|
|                                   |                          |       |                               | IA Única (h) | 1ª IA   | 2ª IA   | Int. IAs (h)         | IA Única          | IA Dupla          |         |            |
| Salamon; Lightfoot 1970 - Exp 2 * | Estro Natural            | C     | 150                           | 1 - 15       | 1 - 15  | 13 - 27 | 12                   | 41,3<br>(19/46)   | 46,5<br>(20/43)   | 5,2     | < 0,01     |
|                                   | Estro Natural            | C     | 150                           | 1 - 15       | 1 - 15  | 13 - 27 | 12                   | 17,8<br>(8/45)    | 25,6<br>(11/43)   | 7,8     | < 0,01     |
|                                   | Estro Natural            | C     | 150                           | 1 - 15       | 1 - 15  | 13 - 27 | 12                   | 8,7<br>(4/46)     | 44,2<br>(19/43)   | 35,5    | < 0,01     |
| Salamon; Lightfoot 1970 - Exp 3 * | Estro Natural            | C     | 80                            | 1 - 15       | 1 - 15  | 13 - 27 | 12                   | 39,7<br>(46/116)  | 53<br>(61/115)    | 13,3    | < 0,05     |
| Salamon, 1971 - Exp 1 *           | E.N. ou 2° estro pós DIV | C     | 150                           | 1 - 2        | 1 - 15  | 10 - 25 | 10                   | 42,9<br>(33/77)   | 59,5<br>(47/79)   | 16,6    | < 0,02     |
|                                   | E.N. ou 2° estro pós DIV | F     | 150                           | 1 - 2        | 1 - 15  | 10 - 25 | 10                   | 69,1<br>(47/68)   | 78,6<br>(55/70)   | 10,5    | < 0,02     |
| Salamon, 1971 - Exp 2 *           | E.N. ou 2° estro pós DIV | C     | 150                           | 1 - 2        | 1 - 2   | 11 - 12 | 10                   | 40,9<br>(38/93)   | 55,1<br>(54/98)   | 14,2    | < 0,02     |
|                                   | E.N. ou 2° estro pós DIV | C     | 150                           | 1 - 2        | 1 - 2   | 11 - 12 | 10                   | 39,1<br>(36/92)   | 50,5<br>(48/95)   | 11,4    | < 0,02     |
| Visser; Salamon, 1973 *           | 2° estro pós DIV         | C     | 180                           | 1 - 15       | 1 - 15  | 8 - 23  | 8                    | 22,9<br>(8/35)    | 57,1<br>(20/35)   | 34,2    | < 0,001    |
|                                   | 2° estro pós DIV         | C     | 180                           | 1 - 15       | 1 - 15  | 8 - 23  | 8                    | 35,3<br>(12/34)   | 54,5<br>(18/33)   | 19,2    | < 0,001    |
|                                   | 2° estro pós DIV         | F     | 180                           | 1 - 15       | 1 - 15  | 8 - 23  | 8                    | 54,3<br>(19/35)   | 77,1<br>(27/35)   | 22,8    | < 0,001    |
| Visser; Salamon, 1974 *           | 2° estro pós DIV         | C     | 90                            | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 19,4<br>(7/36)    | 35,3<br>(12/34)   | 15,9    | < 0,001    |
|                                   | 2° estro pós DIV         | C     | 180                           | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 29,7<br>(11/37)   | 57,6<br>(19/33)   | 27,9    | < 0,001    |
|                                   | 2° estro pós DIV         | C     | 90                            | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 30,8<br>(12/39)   | 37,1<br>(13/35)   | 7,0     | < 0,001    |
|                                   | 2° estro pós DIV         | C     | 180                           | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 34,2<br>(13/38)   | 54,5<br>(18/33)   | 20,3    | < 0,001    |
| Salamon, 1977 *                   | DIV                      | C     | 90                            | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 31,1<br>(14/45)   | 34,1<br>(15/44)   | 3,0     |            |
|                                   | DIV                      | C     | 180                           | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 46,5<br>(20/43)   | 48,9<br>(22/45)   | 2,4     |            |
|                                   | DIV                      | C     | 360                           | 12 - 14      | 12 - 14 | 23 - 25 | 11                   | 55,6<br>(25/45)   | 55,8<br>(24/43)   | 0,2     |            |
| Salamon, 1979 *                   | 2° estro pós DIV         | R     | 150                           | 12 - 14      | 12 - 14 | 24 - 26 | 12                   | 34,6<br>(72/208)  | 55,2<br>(112/203) | 20,6    | < 0,001    |
| Muñoz et al., 2002 <sup>◊</sup>   | MAP (12d)                | C     | 200                           | 18           | 3       | 6       | 3                    | 20,5              | 22,0              | 1,5     |            |
|                                   | MAP (12d)                | C     | 200                           | 18           | 6       | 12      | 6                    | 20,5              | 31,8              | 11,3    |            |
|                                   | MAP (12d)                | C     | 200                           | 18           | 12      | 18      | 5                    | 20,5              | 21,7              | 1,2     |            |
| Simonetti et al., 2002 *          | MAP (14d) + eCG(400UI)   | F     | 300                           | 7 - 11       | 3 - 4   | -       | 8 - 9                | 64,4<br>(67/104)  | 67,7<br>(42/62)   | 3,0     | > 0,05     |
| Paulenz et al., 2003 *            | Estro Natural            | R     | 150                           | 12 - 24      | 12 - 24 | -       | 24                   | 56,8<br>(150/264) | 61,6<br>(183/297) | 4,8     | = 0,06     |
| Jha et al., 2020 <sup>◊</sup>     | 2x PGF                   | C     | 200                           | 12 - 18      | 10 - 12 | 16 - 18 | 6                    | 16,7<br>(4/24)    | 26,1<br>(6/23)    | 9,4     | > 0,05     |
|                                   | 2x PGF                   | C     | 100                           | 12 - 18      | 10 - 12 | 16 - 18 | 6                    | 0 (0/18)          | 12,5<br>(3/24)    | 12,5    |            |
| Palacios et al., 2022 *           | E.N.                     | R     | 200                           | 5 - 16       | 5 - 16  | 29 - 40 | 24                   | 34 (8/23)         | 43 (6/14)         | 9,0     | = 0,06     |
|                                   | E.N.                     | R     | 200                           | < 5          | < 5     | < 29    | 25                   | 37 (4/11)         | 40 (4/10)         | 3,0     | = 0,06     |
|                                   | E.N.                     | R     | 200                           | 16 - 24      | 16 - 24 | 40 - 48 | 24                   | 42 (9/21)         | 42 (5/12)         | 0,0     | = 0,06     |

As linhas dentro dos diferentes estudos representam diferentes grupos de inseminação única, os quais são comparados com os resultados de dupla IA (colunas). Símbolos na coluna autores: • estudos que utilizaram a taxa de parição como resultado; \* estudos que utilizaram taxa de fertilidade; ◇ estudos que utilizaram a taxa de prenhez como resultado. Sêmen: fresco (F), resfriado (R) ou congelado (C). Dose inseminante ( $\times 10^6$ ) de espermatozoides móveis. Os intervalos de tempo correspondem aos momentos de inseminação após a detecção do estro. IA: inseminação artificial p.p: pontos percentuais; E.N.: Estro Natural; MAP: acetato de medroxiprogesterona; DIV: dispositivo intravaginal; eCG: gonadotrofina coriônica equina; PGF: prostaglandina F2 $\alpha$ .

Tabela 2. Resultados reprodutivos obtidos a partir da realização de inseminação única ou dupla em tempo fixo em ovinos, de acordo com o protocolo hormonal, método de preservação do sêmen, número de espermatozoides na dose inseminante e intervalos de inseminação.

| Autor                                     | Tratamento Hormonal         | Sêmen | Dose Ins. (x10 <sup>6</sup> ) | IA única (h) | Dupla IA (h)      |                   |              | Resultados Obtidos (%) |               |         |            |
|---|-----------------------------|-------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|---------------|---------|------------|
|   |                             |       |                               |              | 1 <sup>a</sup> IA | 2 <sup>a</sup> IA | Int. IAs (h) | IA Única               | IA Dupla      | ≠ (p.p) | Valor de P |
| Smith et al., 1978 *                      | FGA + eCG (500UI)           | R     | 400                           | 56           | 48                | 58                | 10           | 71,7 (66/92)           | 60,2 (56/93)  | -11,5   | < 0,01     |
| Hackett et al., 1981 *                    | 2x PFG                      | R     | 450                           | 60           | 60                | 72                | 12           | 35 (11/31)             | 52 (15/29)    | 17,0    |            |
|   | 2x PFG                      | R     | 450                           | 72           | 60                | 72                | 12           | 52 (16/31)             | 52 (15/29)    | 0,0     |            |
| Acritopoul ou-<br>Fourcroy et al., 1982 * | 2x PFG                      | F     | 160                           | 56           | 56                | 66                | 10           | 54,8 (23/42)           | 61,9 (26/42)  | 7,10    | > 0,05     |
|   | 2x PFG                      | F     | 160                           | 50           | 56                | 66                | 10           | 37,5 (12/32)           | 61,9 (26/42)  | 24,4    | < 0,05     |
|   | 2x PFG                      | F     | 160                           | 66           | 56                | 66                | 10           | 30,8 (12/39)           | 61,9 (26/42)  | 31,1    | < 0,05     |
| Langford, 1982 *                          | FGA (12d) + eCG(500UI)      | R     | 450                           | 54           | 54                | 60                | 6            | 67,0 (14/21)           | 61,0 (11/18)  | -6,0    |            |
|   | FGA (12d) + eCG(500UI)      | R     | 450                           | 57           | 54                | 60                | 6            | 67,0 (12/18)           | 61,0 (11/18)  | -6,0    |            |
|   | FGA (12d) + eCG(500UI)      | R     | 450                           | 60           | 54                | 60                | 6            | 37,0 (7/19)            | 61,0 (11/18)  | 24,0    |            |
|   | FGA (12d)                   | R     | 450                           | 54           | 54                | 60                | 6            | 11,0 (2/18)            | 33,0 (7/21)   | 22,0    |            |
|   | FGA (12d)                   | R     | 450                           | 57           | 54                | 60                | 6            | 11,0 (2/18)            | 33,0 (7/21)   | 22,0    |            |
|   | FGA (12d)                   | R     | 450                           | 60           | 54                | 60                | 6            | 26,0 (5/19)            | 33,0 (7/21)   | 7,0     |            |
| Langford et al, 1982 *                    | FGA (12d) + eCG(500UI)      | R     | 450                           | 54           | 54                | 59                | 5            | 55 (26/47)             | 56 (30/54)    | 1,0     |            |
|   | FGA (12d) + eCG(500UI)      | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 73 (35/48)             | 69 (34/49)    | -4,0    |            |
|   | FGA (12d) + eCG(500UI)      | R     | 450                           | 56           | 56                | 60                | 4            | 67 (31/46)             | 76 (34/45)    | 9,0     |            |
| Langford et al, 1983 *                    | 30mg FGA (12d) + eCG(500UI) | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 52 (11/21)             | 70 (14/20)    | 18,0    | > 0,05     |
|   | 30mg FGA (12d)              | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 10 (2/20)              | 11 (2/19)     | 1,0     | > 0,05     |
|   | 40mg FGA (12d) + eCG(500UI) | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 69 (9/13)              | 80 (8/10)     | 11,0    | > 0,05     |
|   | 40mg FGA (12d)              | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 31 (4/13)              | 20 (2/10)     | -11,0   | > 0,05     |
| Langford, 1986 *                          | 30mg FGA (14d) + eCG(500UI) | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 39 (37/96)             | 27 (27/99)    | -12     |            |
|   | 40mg FGA (12d) + eCG(500UI) | R     | 450                           | 55           | 55                | 60                | 5            | 68 (79/117)            | 69 (29/42)    | 1       |            |
| Fukui et al., 1991 *                      | MAP (9d) + eCG(600UI)       | F     | 500                           | 36           | 30                | 42                | 12           | 44,6 (25/56)           | 50,9 (29/57)  | 6,3     | < 0,05     |
|   | 500mg P4 (9d) + eCG(600UI)  | F     | 500                           | 36           | 30                | 42                | 12           | 46,6 (27/58)           | 50 (30/60)    | 3,4     | < 0,05     |
| Ismaya; Sietimboel, 1995 *                | 2x PFG                      | F     | 150                           | 48           | 48                | 72                | 24           | 50,0                   | 66,7          | 16,7    |            |
|   | 2x PFG                      | F     | 150                           | 48           | 48                | 72                | 24           | 50,0                   | 16,6          | -33,4   |            |
| Menchaca et al., 2005 <sup>◊</sup>        | MAP (6d) + PGF + eCG(250UI) | R     | 200                           | 48           | 48                | 54                | 6            | 34,7 (17/49)           | 23,4 (11/47)  | -11,3   | < 0,05     |
|   | MAP (6d) + PGF + eCG(250UI) | R     | 200                           | 54           | 48                | 54                | 6            | 10,6 (5/47)            | 23,4 (11/47)  | 12,8    | < 0,05     |
| Simonetti et al., 2014 <sup>◊</sup>       | MAP (14d) + eCG(300UI)      | F     | 150                           | 54           | 48                | 60                | 12           | 9,1 (1/11)             | 50 (6/12)     | 40,9    | < 0,05     |
| Burataran et al., 2024 <sup>◊</sup>       | 2x PFG (15d)                | F     | 150                           | 54           | 44                | 68                | 24           | 66,4 (83/125)          | 73,8 (93/126) | 7,4     | < 0,05     |
|   | 2x PFG (15d)                | F     | 150                           | 44           | 44                | 68                | 24           | 64,1 (82/128)          | 73,8 (93/126) | 9,7     | < 0,05     |
|   | 2x PFG (15d)                | F     | 150                           | 68           | 44                | 68                | 24           | 66,7 (84/126)          | 73,8 (93/126) | 7,1     | < 0,05     |

As linhas dentro dos diferentes estudos representam diferentes grupos de inseminação única, os quais são comparados com os resultados de dupla IATF (colunas). Símbolos na coluna autores: • estudos que utilizaram a taxa de parição como resultado; \* estudos que utilizaram a taxa de concepção como resultado;  $\diamond$  estudos que utilizaram a taxa de prenhez como resultado. Sêmen: fresco (F), resfriado (R) ou congelado (C). Dose inseminante ( $\times 10^6$ ) de espermatozoides móveis. IA: inseminação artificial; p.p: pontos percentuais; MAP: acetato de medroxiprogesterona; FGA: acetato de fluorogestona; eCG: gonadotrofina coriônica equina; PGF: prostaglandina F $2\alpha$ ; UI: unidades internacionais.

### 3.3 Artigo 3

#### **Estratégias para incremento da fertilidade e da viabilidade da IATF em ovinos**

Gabriel Maggi, Jéssica Lazzari, Fabiane Pereira de Moraes, Fernando Caetano de Oliveira, Julia Nobre Blank Camozzato, Rafael Gianella Mondadori, Arnaldo Diniz Vieira, Bernardo Garziera Gasperin

Será submetido à revista Animal Reproduction

## Artigo de pesquisa aplicada

### Estratégias para incremento da fertilidade e da viabilidade da IATF em ovinos

Gabriel Maggi<sup>1</sup>(<https://orcid.org/0009-0006-2786-824X>), Jéssica Lazzari<sup>1</sup>(<https://orcid.org/0000-0003-1832-4575>), Fabiane Pereira de Moraes<sup>1</sup>(<https://orcid.org/0000-0003-2502-4108>), Fernando Caetano de Oliveira<sup>2</sup>(<https://orcid.org/0000-0002-5191-9901>), Julia Nobre Blank Camozzato<sup>2</sup>(<https://orcid.org/0009-0005-2954-5084>), Monique Tomazele Rovani<sup>2</sup>(<https://orcid.org/0000-0001-8257-3635>), Rafael Gianella Mondadori<sup>1</sup>(<https://orcid.org/0000-0003-0578-8469>), Arnaldo Diniz Vieira<sup>1</sup>(<https://orcid.org/0000-0001-6410-2354>), Bernardo Garziera Gasperin<sup>1\*</sup>(<https://orcid.org/0000-0002-3715-2345>).

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Universitário, 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

\*Correspondência: Bernardo Garziera Gasperin, [bggasperin@gmail.com](mailto:bggasperin@gmail.com), Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, s/n - Caixa Postal 354 - Campus Universitário, CEP: 96160-000, Capão do Leão, RS, Brasil.

## RESUMO

Os principais protocolos de sincronização do estro em ovinos, associados à inseminação artificial apresentam taxas de prenhez variáveis, apresentando margem para melhoria. O presente estudo objetivou: (1) avaliar o efeito da dupla inseminação artificial em tempo fixo

(IATF); (2) avaliar a eficácia da dose de 125µg de cloprostenol em induzir a luteólise; e (3) determinar a curva de disponibilidade sérica de β-hCG após a aplicação de 100, 250 ou 500UI por via intramuscular. No Exp. 1 ovelhas receberam dispositivos intravaginais (DIVs) contendo 60mg de MAP, durante seis dias. Na retirada, os animais receberam 250µg de cloprostenol sódico e 300UI de eCG. No momento da IA, foram aplicados 4µg de buserelina, sendo que as ovelhas foram alocadas em dois grupos: controle (n=127) e 2IA (n=128). O grupo 2IA foi inseminado novamente 14 h após a primeira IATF. No Exp. 2, ovelhas receberam dispositivos intravaginais contendo 60mg de MAP, durante seis dias. Na retirada, os grupos PGF 125 (n=41) e PGF 250 (n=40), receberam 125 e 250µg de cloprostenol, respectivamente. Após, as ovelhas foram expostas a monta natural. No Exp. 3, nos grupos hCG100 (n=5), hCG250 (n=5) e hCG500 (n=5), as ovelhas foram tratadas com 100, 250 ou 500 UI de hCG, respectivamente. Amostras de sangue foram coletadas 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h após a aplicação. No Exp 1., a dupla IATF possibilitou incremento de 12 p.p. em relação a inseminação única. No Exp 2., as doses de 250 e 125µg de cloprostenol não diferiram quanto a taxa de expressão de estro (65 e 81%, P=0,12), taxa de concepção (69 e 67%, P=0,83) e taxa de prenhez (45 e 54%, P=0,39). No Exp 3., as três doses de hCG apresentaram pico sérico 6 h após os tratamentos, sendo que a gonadotrofina foi detectada em todos os momentos avaliados. Conclui-se que a dupla IATF e a dose reduzida de cloprostenol podem levar a redução do custo do tratamento hormonal por prenhez obtida. Ainda, a curva de concentração sérica de hCG pode fornecer subsídio para a escolha das doses a serem utilizadas para indução da ovulação em ovelhas.

**Palavras-Chave:** Dupla inseminação, cloprostenol, gonadotrofina coriônica humana, ovelhas, inseminação artificial.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de pequenos ruminantes representa uma importante atividade econômica e social em muitos países (Haenlein, 2001). A busca por melhorias na eficiência reprodutiva dos rebanhos torna-se necessária, por ser um dos principais fatores que afetam diretamente a rentabilidade dos rebanhos (Amer et al., 1999). As biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que está diretamente associada com tratamentos hormonais para o controle do ciclo estral, são importantes alternativas para a obtenção de ganho genético e melhor eficiência reprodutiva dentro de diferentes sistemas produtivos (Abril-Parreño et al., 2021).

Os principais tratamentos hormonais para sincronização do estro e ovulação utilizados na ovinocultura consistem na utilização de dispositivos intravaginais (DIVs) contendo progestágenos associados à administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Hashim et al., 2013). Porém, estes protocolos apresentam taxas de prenhez variáveis, as quais podem estar relacionadas à dispersão do momento da ovulação, tornando a IA menos síncrona, apresentando assim margem para estudos visando a melhoria.

A dupla inseminação é descrita há várias décadas, tanto em tempo fixo (Langford et al., 1982) com a utilização de diferentes protocolos hormonais, quanto após a identificação de estro (Paulenz et al., 2003). A dupla IA poderia representar uma possibilidade de incremento das prenhez sem expressiva alteração nos custos da técnica, tendo gastos apenas com a mão de obra. Porém, a aplicação da dupla IA apresenta resultados inconsistentes em relação ao acréscimo obtido na taxa de prenhez (Acritopoulou-Fourcroy et al., 1982). Além disso, a maioria dos estudos são antigos e utilizaram protocolos hormonais e/ou doses inseminantes que não são atualmente utilizados.

Além das limitações descritas, a redução de custo dos tratamentos, seja pelo uso de novos fármacos, ou pela diminuição das doses, sem prejudicar indicadores reprodutivos, é

essencial para maior difusão das biotécnicas. Nesse aspecto, estudos sugerem que baixas doses de cloprostenol são eficientes para induzir a luteólise em ovelhas (Haresign and Acritopoulou, 1978). Entretanto, revisando a literatura, não foram encontrados estudos comparando diferentes doses de cloprostenol na sincronização de estro em ovelhas.

Outro desafio na utilização de protocolos hormonais para o controle do ciclo estral em ovinos é o fato de que a suplementação de gonadotrofinas depende exclusivamente da utilização de eCG. A ausência de alternativas para induzir o crescimento folicular e ovulação pode comprometer a eficiência dos tratamentos hormonais, uma vez que a produção de eCG requer coleta de sangue de éguas prenhes, o que pode ser um limitante considerando o bem-estar animal (Vilanova et al., 2019). A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma alternativa promissora, por sua função semelhante ao hormônio luteinizante (LH), podendo ser usada como indutor de ovulação (Kinser et al., 1983).

Com base no acima exposto, os objetivos do presente estudo foram: (1) avaliar o efeito da utilização de dupla IATF, associada à aplicação de buserelina no momento da primeira IATF, sobre a taxa de prenhez de ovelhas; (2) avaliar se 125 µg de PGF, equivalente à metade da dose usual, é suficiente para induzir a luteólise; e (3) determinar a curva de concentração sérica de β-hCG após a aplicação de 100, 250 e 500UI por via intramuscular.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram conduzidos três experimentos durante os períodos de transição e estação reprodutiva (novembro a abril), em fazendas comerciais do Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo utilizou o total de 351 ovelhas em idade reprodutiva, mantidas em campo nativo, com escore de condição corporal (ECC) mínimo de 2,5 (em uma escala de 0 a 5) conforme descrito por Russel et al. (1969). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

### *2.1 Experimento 1*

Para avaliar se a dupla IATF aumentaria a taxa de prenhez, 255 ovelhas receberam um dispositivo intravaginal (DIV), contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP; Fagron, São Paulo, Brasil), durante 7 dias. No momento da retirada do dispositivo, os animais receberam 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; SincroeCG, Ourofino, Cravinhos, Brasil; ou Novormon, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 250µg de cloprostenol sódico (PGF; Estron, Agener União, São Paulo, Brasil). Todas as ovelhas foram inseminadas 54 h após a retirada do DIV, juntamente com a aplicação de 4µg de buserelina (Sincroforte, Ourofino, Cravinhos, Brasil). No momento da IATF, as ovelhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Controle (n=127), no qual os animais não receberam tratamentos adicionais; e grupo 2 IA (n=128), no qual os animais foram submetidos à segunda inseminação 14 h após. As inseminações foram realizadas pela via cervical superficial, utilizando sêmen fresco, obtido de um pool de sêmen de 13 carneiros com fertilidade conhecida (três ou quatro carneiros por réplica). O sêmen foi diluído em leite UHT e as doses inseminantes foram produzidas contendo  $100 \times 10^6$  espermatozoides móveis em um volume de 100µL. Todas as IAs, nas diferentes réplicas, foram realizadas pelo mesmo inseminador. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a primeira inseminação, por ultrassonografia transretal com um transdutor de 7.5 MHz (Infinit i3V, Jiangsu, China).

### *2.2 Experimento 2*

Para avaliar a eficácia de duas doses de prostaglandina na sincronização do estro e taxa de prenhez após a monta natural (MN), 81 ovelhas receberam DIV contendo 60mg de MAP (Fagron, São Paulo, Brasil), por seis dias. Na retirada do dispositivo, os animais foram alocados em dois grupos: PGF 125 (n=41), tratados com 125µg (0,5 ml) de cloprostenol sódico (Estron, Agener União, São Paulo, Brasil); ou PGF 250 (n=40), tratados com 250µg (1 ml) do mesmo análogo. A monta natural foi registrada utilizando proporção macho:fêmea de 10%, com

carneiros identificados na região esternal com pó xadrez diluído em graxa. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após o fim do contato das fêmeas com os carneiros, por ultrassonografia transretal, conforme descrito no experimento anterior.

### 2.3 Experimento 3

A fim de determinar a curva de concentração sérica de hCG, 15 ovelhas previamente sincronizadas com DIV contendo 60mg MAP (Fagron, São Paulo, Brasil) durante 14 dias, foram alocadas aleatoriamente em três grupos: hCG100 (n=5), hCG250 (n=5) e hCG500 (n=5), nos quais as fêmeas foram tratadas com 100, 250 e 500 UI de hCG (Chorulon, MSD, São Paulo, Brasil), respectivamente. Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa da jugular, com auxílio de tubos *vacutainer* às 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h após a aplicação. O soro foi obtido após a centrifugação das amostras a 5000 rpm, durante 10 minutos, para posterior quantificação de  $\beta$ -hCG sérico pelo método de quimiluminescência utilizando o kit Elecsys HCG- $\beta$  (COBAS; Roche Diagnostics), com sensibilidade de  $<0.6$  mUI/mL.

### 2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software JMP Pro 16 (SAS Institute). As taxas de manifestação de estro, de prenhez e de concepção foram analisadas por regressão logística. As concentrações de  $\beta$ -hCG foram analisadas por modelos mistos para dados repetidos, utilizando o software SAS. Todas as análises consideraram a significância de 5%.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Experimento 1

O grupo controle apresentou taxa de prenhez total de 34,6% (44/127) sendo esse resultado inferior ( $P=0,04$ ), quando comparado com o grupo 2IA, no qual obteve-se a taxa de

preñez de 46,9% (60/128). Não foi observado efeito das diferentes réplicas ( $P=0,95$ ) nem interação réplica x grupo ( $P=0,69$ ; Figura 1).

### 3.2 Experimento 2

Não foram observadas diferenças na taxa de expressão do estro ( $P=0,12$ ), taxa de preñez ( $P=0,39$ ) e taxa de concepção ( $P=0,83$ ), em ovelhas tratadas com 125 ou 250 $\mu$ g de cloprostenol (Figura 2).

### 3.3 Experimento 3

As maiores concentrações de  $\beta$ -hCG, foram observadas cerca de 6h após a administração de hCG por via intramuscular. O maior pico foi observado nos animais tratados com 500 UI ( $P=0,002$ ), não sendo observada diferença entre os grupos hCG100 e hCG250. Às 24 h, o grupo hCG500 diferiu do hCG100, porém não foram observadas diferenças entre o grupo hCG250 e os demais. Às 36 e 48h, não foram observadas diferenças nas concentrações de hCG entre os três grupos (Figura 3).

O grupo hCG100 manteve sua concentração máxima entre 6 e 24 h após a aplicação, não havendo diferença de concentração neste intervalo ( $P= 0,12$ ), porém, esses valores foram superiores às concentrações observadas em 36 e 48 h ( $P= 0,02$ ;  $P= 0,005$ ). Ao avaliar o grupo hCG250, não foram observadas diferenças entre os momentos de pico máximo de concentração até 12 h após a aplicação ( $P= 0,99$ ), com posterior queda. Foi possível observar comportamento semelhante no grupo hCG500, apresentando concentrações máximas até 12 h após a aplicação IM, com subsequente diminuição dos níveis.

## 4 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram: 1) a dupla IATF possibilitou incremento na taxa de preñez; 2) a dose de 125 $\mu$ g de cloprostenol sódico é tão eficaz quanto 250 $\mu$ g, não afetando a eficiência reprodutiva de ovelhas; 3) o pico de concentração sérica de  $\beta$ -

hCG em ovelhas ocorre 6 h após o tratamento sendo a hCG detectada na circulação por, no mínimo, 48 h.

No experimento 1 foi avaliado o efeito de utilização da dupla IATF, associada ao tratamento com busserelina no momento da primeira inseminação (54 h após a retirada do DIV). Nossos resultados demonstraram importante incremento de, aproximadamente, 12 pontos percentuais, na taxa de prenhez total de ovelhas inseminadas duas vezes. É bem estabelecido que a taxa de prenhez após IATF depende da sincronia entre as ovulações e as inseminações, sendo que ovelhas com estro sincronizado geralmente ovulam em torno de 65 h após a retirada do DIV (Souza et al., 1995). Recentemente, demonstrou-se que o uso de busserelina em ovelhas é eficiente em ocasionar um pico de LH, além de aumentar as taxas de prenhez, quando utilizada no momento da IATF (Pereira et al., 2024). Neste sentido, acredita-se no potencial efeito aditivo do uso de busserelina e da realização de duas inseminações para garantir ovulações mais síncronas e maior número de espermatozoides viáveis, respectivamente.

Contrapondo esta possível explicação, Salamon (1977) sugere que o acréscimo observado na taxa de prenhez após a aplicação da dupla IA está relacionado com o aumento da dose inseminante. No referido estudo, não foi observada diferença entre ovelhas inseminadas com doses contendo o mesmo número total de células considerando o protocolo de inseminação única ( $180 \times 10^6$ ) ou protocolo de dupla IA ( $90 \times 10^6$  espermatozoides móveis/dose em cada IA), tendo obtido taxas de parto de 46,5 e 34,1%, respectivamente. Portanto, estudos futuros são necessários para avaliar se o uso de maior número de células em uma única IATF possibilita incremento na taxa de prenhez equivalente ao uso de dupla IATF.

Ao utilizar tratamento hormonal igual ao utilizado no presente experimento, Pereira et al. (2024) reportaram taxa média de prenhez de 50,3% após a realização de uma única inseminação, sendo esta superior à taxa média de prenhez do grupo controle do presente estudo (34,6%), porém, semelhante à taxa de prenhez observada nos animais submetidos a dupla IA

(46,9%). Vale ressaltar que os estudos foram realizados em diferentes momentos e propriedades comerciais distintas, porém, ambos apresentaram taxas de prenhez satisfatórias, com resultados próximos a 50%. Sendo assim, não é possível afirmar que sistemas produtivos que apresentam taxas de prenhez satisfatórias sejam beneficiados pelo uso da dupla IA, sendo necessários novos estudos para avaliar a influência da fertilidade dos rebanhos sobre a viabilidade desta técnica.

Além de buscar estratégias para aumentar a eficiência das biotécnicas da reprodução, a redução do custo e o uso racional dos hormônios para o controle do ciclo estral são essenciais para a maior adoção das biotécnicas. Nesse aspecto, a redução da dose dos hormônios pode diminuir o custo dos protocolos, bem como o volume administrado e, conseqüentemente, a reação no local da aplicação. Portanto, optou-se por avaliar a dose de prostaglandina F2 alfa (PGF), um mediador inflamatório com potente efeito luteolítico.

A PGF e seus análogos são de extrema importância em protocolos de curta duração (5 a 7 dias) com progestágenos, devido a possibilidade de haver corpos lúteos (CL) funcionais no momento da remoção dos DIVs (Oliveira et al., 2013). Neste sentido, o cloprostenol é um potente análogo sintético da PGF, que é frequentemente utilizado no controle do ciclo estral de ovinos. No experimento 2, ao avaliar duas doses de cloprostenol, não se observou diferenças nos parâmetros estudados. As doses de 125 e 250 µg de cloprostenol, foram capazes de promover a luteólise de forma similar em ovelhas previamente tratadas com progestágeno durante seis dias. Assim, é possível indicar a menor dose, o que se torna interessante economicamente, reduzindo o custo dos protocolos de sincronização do estro de ovelhas, sem afetar a performance reprodutiva. Além disso, a redução da dose repercute em menor volume de administração e, conseqüentemente, menor reação local e menor desperdício de fármaco.

As taxas de manifestação de estro, em ambos os grupos (81 e 65%), foram semelhantes às observadas por Texeira et al. (2016) (72,7%), utilizando protocolos com 6 dias de exposição a progestágenos e posterior administração de 75µg de d-cloprostenol e 300 UI de eCG, no

momento da retirada do DIV. A taxa de prenhez observada por Viñoles et al. (2001), ao utilizar protocolo de 6 dias de exposição a progestágeno associado à administração de 250 UI de eCG (58%), corrobora com as taxas observadas nos dois grupos do presente estudo (54 e 45%).

A dose de 125µg de cloprostenol é indicada por Abecia et al. (2011), para protocolos de sincronização do estro em ovinos e caprinos. Entretanto, na referida revisão de literatura os autores não demonstram resultados de estro e fertilidade após tratamento com diferentes doses. Doses ainda menores às utilizadas no presente estudo, como 50µg, já foram indicadas como eficazes na indução da luteólise em ovinos (Baird and Scaramuzzi, 1975), porém, os autores avaliaram apenas características do corpo lúteo (CL) após o tratamento, em número reduzido de animais. A eficácia da luteólise com doses reduzidas de cloprostenol pode ser relacionada à maior afinidade com os receptores de prostaglandinas no CL em relação ao dinoprost (Re et al., 1994), associada à sua meia vida mais longa (Baird and Scaramuzzi, 1975).

Conforme citado anteriormente, estratégias luteolíticas são indispensáveis nos protocolos de sincronização de estro e ovulação em ovelhas. Porém, para otimizar o controle da ovulação e a função luteal, faz-se necessária a busca por fármacos indutores de ovulação e que, preferencialmente, também possuam efeito luteotrófico, como é o caso da hCG. Portanto, no experimento 3, foram avaliadas as concentrações séricas de β-hCG após administração de três doses. O pico de concentração foi observado 6 h após o tratamento, independentemente da dose utilizada e, após 48 h, todos os grupos apresentavam média de concentração de β-hCG superiores a 5 mUI/mL, sendo estes valores superiores aos da sensibilidade do teste, confirmando assim a presença de hCG em nível sérico.

Ao nosso conhecimento, não há na literatura outros estudos que avaliaram a curva de disponibilidade de hCG em ovinos, porém, estudos semelhantes estão disponíveis em outras espécies de ruminantes, como nos caprinos, nos quais foi observado um pico de concentração de hCG ocorrendo aproximadamente 11 h após a aplicação de 500UI desta gonadotrofina, e

tempo médio de eliminação de 70 h (Saleh et al., 2012). No referido estudo, foi possível identificar a gonadotrofina cinco dias após sua aplicação. Já em bovinos, o tratamento com 3300 UI de hCG resultou em concentração máxima de hCG 4 h após o tratamento, mantendo um platô até aproximadamente 12 h, com posterior redução até as 48 h. Setenta e duas horas após o tratamento, as concentrações de hCG retornaram aos níveis basais observados na hora 0 (Nascimento et al., 2013).

Devido ao fato da hCG apresentar função semelhante ao LH, pois ambos os hormônios se ligam ao mesmo receptor (Laphorn et al., 1994), esta gonadotrofina vem sendo estudada como indutor da ovulação em ovelhas como alternativa à utilização de eCG. Em um estudo recente, ovelhas tratadas com a dose de 500 UI de hCG no momento da retirada do DIV com progestágeno ou 24 h após, apresentaram menores taxas de expressão de estro e prenhez após monta natural, quando comparadas com ovelhas que receberam 400 UI de eCG no momento da retirada do DIV (Bruno-Galarraga et al., 2021). Ao utilizar 500 UI de hCG 24 h após a remoção do DIV e aplicação de eCG, Dias et al. (2018) observaram que as fêmeas ovularam de forma mais síncrona em relação às que não receberam hCG, porém, foram observadas menores taxas de expressão de estro e prenhez.

Além da indução da ovulação a hCG tem sido estudada na prevenção da regressão lútea prematura e na indução de CL acessório, com o objetivo de diminuir as perdas embrionárias. A aplicação de 100 UI de hCG nos dias 11, 12 e 13 após a monta natural, possibilitou maiores taxas de prenhez, em comparação com animais tratados com solução salina, indicando possível redução na mortalidade embrionária. Sugere-se assim que as perdas embrionárias em ovinos estão relacionadas, em parte, ao suporte inadequado de progesterona (Kittok et al., 1983). Ao aplicar 300 UI de hCG 96 h após a retirada do DIV, em um protocolo de superovulação, Dias et al. (2022), observaram aumento nos níveis séricos de progesterona, além de um efeito positivo na manutenção da função lútea. Corroborando com os estudos apresentados, Fernandez

et al., (2019), não observaram incremento nas taxas de prenhez de ovelhas tratadas com 300 UI de hCG quatro dias após a IATF, porém, observaram menor perda embrionária até os 33 dias de gestação, relacionando esses resultados ao aumento da progesterona ocasionado pela formação de CLs acessórios, após o tratamento com hCG. Neste sentido, os resultados do presente experimento apresentam a disponibilidade sérica de hCG em diferentes doses, fornecendo subsídio para o ajuste de doses e para a determinação do momento de aplicação desta gonadotrofina para indução da ovulação ou para prevenir a luteólise.

## CONCLUSÃO

Concluimos que a realização da dupla IATF (54 h e 68 h após a remoção do DIV) aumenta a taxa de prenhez, quando comparado à IATF única (54 h após a remoção do DIV). Além disso, a dose de 125 µg de cloprostenol é tão eficiente quanto a de 250 µg para promover a sincronização do estro sem afetar as taxas de concepção e prenhez em ovelhas, reduzindo o volume a ser injetado e o custo do protocolo. Já a determinação da curva de biodisponibilidade de hCG pode ser relevante para a utilização desta gonadotrofina em diferentes finalidades.

## REFERÊNCIAS

- Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2012;130:173–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>.
- Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 2011;27:67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.001>.
- Abril-Parreño L, Krogenæs AK, Byrne CJ, Donovan A, Stuen S, Caldas E, et al. Ewe breed differences in cervical anatomy and cervicovaginal mucus properties: An international study. *Theriogenology* 2021;160:18–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.038>.
- Acritopoulou-Fourcroy S, Pappas V, Peclaris G, Zervas N, Skoufis V. Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2alpha or the prostaglandin analogue, ICI 80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nutr Dev* 1982;22:345–54.

- Alvarado-Espino AS, Meza-Herrera CA, Carrillo E, González-Álvarez VH, Guillen-Muñoz JM, Ángel-García O, et al. Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. *Anim Reprod Sci* 2016;167:133–8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.019>.
- Alvarez M, Anel-Lopez L, Boixo JC, Chamorro C, Neila-Montero M, Montes-Garrido R, et al. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals* 2019;54:32–40.
- Amer PR, Mcewan JC, Dodds KG, Davis GH. Economic values for ewe prolificacy and lamb survival in New Zealand sheep. *Livest Prod Sci* 1999;58:75–90.
- Baird DT, Scaramuzzi RJ. Prostaglandin F<sub>2α</sub> and luteal regression in the ewe: comparison with 16 arylxyprostaglandin (I. C. I. 80, 996). *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1975;15:161–74.
- Bruno-Galarraga M, Cano-Moreno V, Lago-Cruz B, Encinas T, Gonzalez-Bulnes A, Martinez-Ros P. The use of hcg for inducing ovulation in sheep estrus synchronization impairs ovulatory follicle growth and fertility. *Animals* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/ani11040984>.
- Burutaran M, Fierro S, Negrín F, Minteguiaga M, Gil J, Olivera–Muzante J. Estrous, ovulation and reproductive responses of ewes synchronized with a long interval prostaglandin–based protocol for timed AI. *Theriogenology* 2024;214:187–91. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.027>.
- Caraty A, Skinner DC. Progesterone Priming Is Essential for the Full Expression of the Positive Feedback Effect of Estradiol in Inducing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Surge in the Ewe. *Endocrinology* 1999;140:165–70.
- Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, Lopez-Sebastian A, Gonzalez-Bulnes A. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect.” *Theriogenology* 2009;71:1018–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.004>.
- Cueto MI, Bruno-Galarraga MM, Fernandez J, Fierro S, Gibbons AE. Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. *Anim Reprod Sci* 2020;221. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106597>.
- Curnock RM, Reed HCB, Logue DN, Maxwell WMC. Artificial Insemination of Ewes with Ram Semen Frozen by the Pellet Method. *Proceedings of the British Society of Animal Production* (1972) 1984;1984:100–100. <https://doi.org/10.1017/s0308229600014562>.
- D’Avila CA, de Moraes FP, Bohn AP, Rovani MT, Vieira AD, Ferreira R, et al. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrus ewes. *Livest Sci* 2022;265. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105070>.
- Dehkordi RS, Mirzaei A, Boostani A. Reproductive efficiency of treated Karakul ewes with short-term progesterone and hCG injections during the non-breeding and breeding seasons. *Anim Reprod Sci* 2022;239. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106969>.
- Dias JH, Gonçalves JD, Arrais AM, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG, Bastos R, et al. Single dose of 300 IU hCG in the early luteal phase in superovulated ewes: Effects on corpora lutea,

progesterone profile, and embryo recovery. *Anim Reprod Sci* 2022;247.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107101>.

Dias LMK, Sales JNS, Viau P, Barros MBP, Nicolau SS, Simões LMS, et al. Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2018;70:122–30. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9679>.

Dutt RH, Casida LE. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology* 1948;43:208–17.

Fair S, Meade KG, Reynaud K, Druart X, De Graaf SP. The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix. *Reproduction* 2019;158:1–13.  
<https://doi.org/10.1530/REP>.

Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Soto AT, de la Sota RL, Cueto MI, Lacau-Mengido IM, et al. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. *Theriogenology* 2019;126:63–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.008>.

Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 2013;79:399–408.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.022>.

Fukui Y, Yamamoto Y, Goda S, Ono H. Single or Double Inseminations at Fixed-Time Basis on Lambing Rate of Ewes Treated with Progestogen-Impregnated Intravaginal Sponges during the Non-Breeding Season. *Japanese Journal of Animal Reproduction* 1991;37:231–5.

Garoussi MT, Mavadati O, Bahonar M, Ragh MJ. The effect of medroxyprogesterone acetate with or without eCG on conception rate of fat-tail ewes in out of breeding season. *Tropical Animal Health and Reproduction* 2020;52:1617–22. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02159-8/Published>.

Gibbons AE, Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Spinelli MV, Cueto MI. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Anim Reprod* 2019;16:803–9.  
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>.

Gizaw S, Tegegne A. Bio-economic and operational feasibility of introducing oestrus synchronization and artificial insemination in simulated smallholder sheep breeding programmes. *Animal* 2018;12:1517–26. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003032>.

Hackett AJ, Langford GA, Robertson HA. Fertility Of Ewes After Synchronization Of Estrus With Prostaglandin F2 $\alpha$  And Artificial Insemination. *Theriogenology* 1981;15:599–603.

Haenlein GFW. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci* 2001;84:2097–115. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74655-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74655-3).

Hansel W, Convey EM. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 1983;57:404–24.

Haresign W, Acritopoulou SA. Controlled breeding in sheep using the prostaglandin analogue, ICI 80996. *Livest Prod Sci* 1978;5:313–9.

Hashim NH, Syafnir, Sembiring M. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. *Biomedical Research* 2013;24:7–12.

- Ismaya, Soetimboel M. Effects of Breed of Sire and Double Insemination on Performance of Reproduction of Local Sheep. *Bulletin of Animal Science* 1995;263–6.
- Jha PK, Alam MdGS, Mansur MdA Al, Talukder MRI, Naher N, Rahman AKMA, et al. Effects of number of frozen-thawed ram sperm and number of inseminations on fertility in synchronized ewes under field condition. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology* 2020;35:190–7. <https://doi.org/10.12750/jarb.35.2.190>.
- Kinser AR, Gibson MF, Vince DL, Scheffrahn NS, Keslera' F DJ. Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone, PMS, hCG AND(OR) GnRH. *Theriogenology* 1983;19:449–64.
- Kittok RJ, Stellflug JN, Lowry SR. Enhanced progesterone and pregnancy rate after gonadotropin administration in lactating ewes 1. *Journal of Animal Science* 1983;56:652–5.
- Langford GA. Influence of body weight and number of Inseminations on fertility of progestogen-treated ewe lambs raised in controlled environments. *J Anim Sci* 1986;62:1058–62.
- Langford GA. Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progestogen-treated sheep in confinement. *J Anim Sci* 1982;54:1205–11.
- Langford GA, Ainsworth L, Wolynetz MS. Reproductive response of progestatogen-treated sheep in confinement to a single and double insemination. *J Anim Sci* 1982;54:12–7.
- Langford GA, Marcus GJ, Batra TR. Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogen-treated sheep. *J Anim Sci* 1983;57:307–12.
- Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994;369:455–61.
- de Lima RS, Martins T, Lemes KM, Binelli M, Madureira EH. Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI. *Theriogenology* 2020;154:128–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.036>.
- Loubser PG, Van Niekerk CH. Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology* 1981;15:547–52.
- Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Efficiency of cidr-based protocols including gnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9040146>.
- Martinez-Ros P, Rios-Abellan A, Gonzalez-Bulnes A. Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrus behavior, ovulatory success and fertility in sheep. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9010009>.
- Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E. Prostaglandin F2a Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. *Reproduction in Domestic Animals* 2004;39:352–5.

- Menchaca A, Pinczak A, Queirolo D. Storage of ram semen at 5 °C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim Reprod* 2005;2:195–8.
- Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:403–13. <https://doi.org/10.1071/RD04037>.
- Muñoz CM, Parraguez G VH, Latorre E V. Efecto del tiempo de inseminación artificial después de la detección de celo sobre la tasa de preñez en ovinos corriedale. *Agricultura Técnica* 2002;62:613–23.
- Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013;96:2873–82. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5895>.
- Oliveira MEF, Barlewski PM, Feliciano MAR. Controle do Ciclo estral . In: Oliveira MEF, Teixeira PPM, Vicente WRR, editors. *Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos*. 1st ed., São Paulo: Editora Med Vet; 2013, p. 71–90.
- Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 2011;75:1232–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.036>.
- Palacios C, Abecia JA, Plaza J, Hidalgo C, de la Fuente LF. Efficiency of Artificial Insemination at Natural Estrus in Organic Churra Ewes. *Vet Sci* 2022;9:370. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070370>.
- Paulenz H, Söderquist L, Ådnøy T, Fossen OH, Berg KA. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology* 2003;60:759–66. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00048-7).
- Penna B, Libonati H, Director A, Sarzedas AC, Martins G, Brandão FZ, et al. Progestin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. *Anim Reprod Sci* 2013;142:71–4. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.006>.
- Pereira RG, Pires OS, Hoefle CA, Fritzen A, Fiordalisi G, Ferst JG, et al. GnRH analogs induce a LH peak and increase pregnancy per timed-AI in ewes. *Theriogenology* 2024;215:132–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.003>.
- Re G, Badino P, Novelli A, Vallisnerit A, Girardi C, Ozzano Emilia P, et al. Specific binding of d-cloprostenol and d-cloprostenol to PG F<sub>2</sub> receptors in bovine corpus luteum and myometrial cell membranes. *J Vet Pharmacol Therap* 1994;17:455–8.
- Rekik M, Haile A, Abebe A, Muluneh D, Goshme S, Ben Salem I, et al. GnRH and prostaglandin-based synchronization protocols as alternatives to progestogen-based treatments in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 2016;51:924–9. <https://doi.org/10.1111/rda.12761>.
- Roy F, Combes B, Vaiman D, Crihiu EP, Pobel T, Delétang F, et al. Humoral Immune Response to Equine Chorionic Gonadotropin in Ewes: Association with Major

Histocompatibility Complex and Interference with Subsequent Fertility. *Biology of Reproduction* 1999;61:209–18.

Salamon S. Fertility following Deposition of Equal Numbers of Frozen-thawed Ram Spermatazoa by Single and Double Insemination. *Aust J Agric Res* 1977;28:477–9.

Salamon S. Fertility of ram Spermatazoa Following Pellet Freezing On Dry Ice at -79 and -140°C\*. *Aust J Biol Sci* 1971;24:183–5.

Salamon S, Lightfoot RJ. Fertility of ram spermatazoa frozen by the pellet method III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *J Reprod Fertil* 1970;22:409–23.

Salamon S, Maxwell W, Firth J. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Anim Reprod Sci* 1979;2:373–85.

Saleh M, Shahin M, Wuttke W, Gauly M, Holtz W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). *Reproduction* 2012;144:77–81. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0093>.

Santos-Jimenez Z, Martinez-Herrero C, Encinas T, Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals* 2020;55:882–4. <https://doi.org/10.1016/j.anire>.

Simonetti L, Lynch GM, Cormick MM. Fixed-time artificial insemination in dairy ewes raised in field conditions in Argentina. *Acta Veterinaria Brasilica* 2014:54–9.

Simonetti L, Ramos G, Gardón JC. Effect of estrus synchronization and artificial insemination on reproductive performance of Merino sheep Efeitos da sincronização do estro e da inseminação artificial sobre a performace reprodutiva de ovelhas Merino. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2002;39:143–6.

Smith PA, Boland MP, Gordon I. Conception rate in ewes: effect of method of breeding and number of inseminations. *J Agric Sci, Camb* 1978;91:511–2.

Souza CJH, Chagas LM, Moura A, Moraes JCF. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. *Ciência Rural* 1995;25:277–81.

Suárez G, Zunino P, Carol H, Ungerfeld R. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 2006;63:39–43. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.01.011>.

Texeira TA, da Fonseca JF, de Souza-Fabjan JMG, de Rezende Carvalheira L, de Moura Fernandes DA, Brandão FZ. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. *Trop Anim Health Prod* 2016;48:545–51. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0989-y>.

Ungerfeld R, Rubianes E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 2002;46:63–6.

Vasconcelos CO de P, Brandão FZ, Martins G, Penna B, Souza-Fabjan JMG de, Lilenbaum W. Análise qualitativa e quantitativa de bactérias da vaginite associadas com implante intravaginal em ovelhas após sincronização de estro. *Ciencia Rural* 2016;46:632–6. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150365>.

Vilanova XM, De Briyne N, Beaver B, Turner P V. Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9121053>.

Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 2001;55:993–1004.

Viñoles C, Rubianes E. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 1998;78:429–31. <https://doi.org/10.4141/A98-015>.

Visser D, Salamon S. Fertility following Inseminations with Frozen-Thawed Reconcentrated and Unconcentrated Ram Semen. *Aust J Biol Sci* 1974;27:423–5.

Visser D, Salamon S. Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris-based diluent\*. *Aust J Biol Sci* 1973;26:513–6.

Young JM, Trompf J, Thompson AN. The critical control points for increasing reproductive performance can be used to inform research priorities. *Anim Prod Sci* 2014;54:645–55. <https://doi.org/10.1071/AN13269>.

Zeleke M, Greyling JPC, Schwalbach LMJ, Muller T, Erasmus JA. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research* 2005;56:47–53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.12.006>.

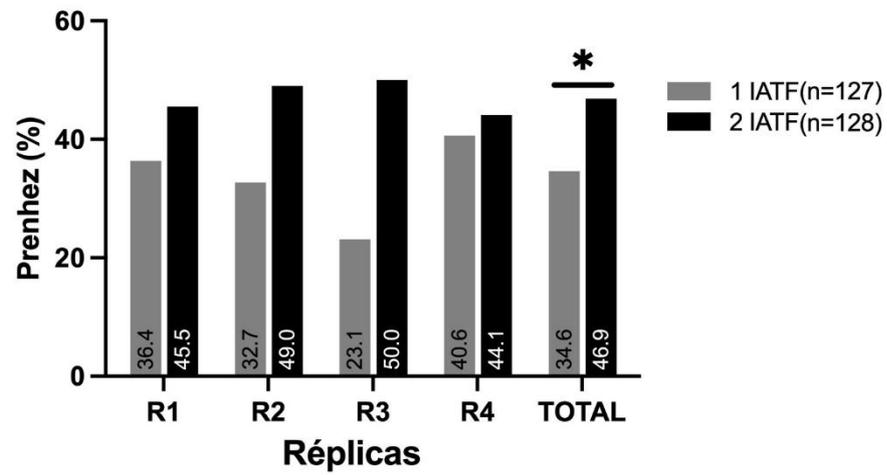


Figura 1. Taxas de prenhez de fêmeas ovinas submetidas a única (1 IATF) ou dupla IATF (2 IATF), de acordo com as quatro réplicas realizadas no Experimento 1. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

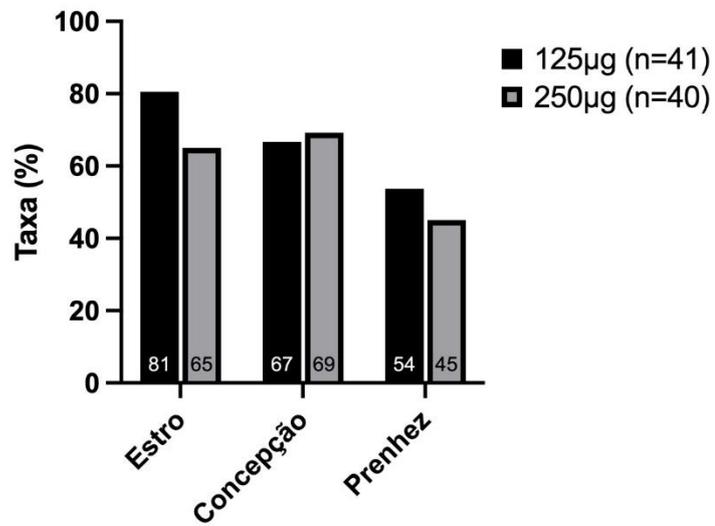


Figura 2. Taxas de expressão do estro, concepção e prenhez de ovelhas tratadas com 125 µg ou 250 µg de cloprostenol no momento da retirada do dispositivo intravaginal e submetidas à monta natural. Os números no interior das barras indicam a proporção de fêmeas (%) em cada grupo (Exp. 2) ( $P>0,05$ ).

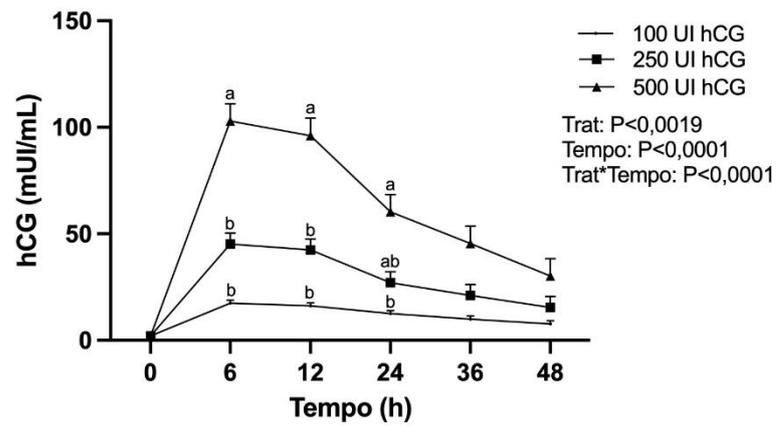


Figura 3. Concentração sérica de  $\beta$ -hCG (mUI/mL) 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h após a aplicação de 100, 250 ou 500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por via intramuscular. Letras diferente indicam diferença significativa entre os grupos em cada momento (Exp.3).

#### **4 Considerações Finais**

Os estudos de revisão demonstraram diversas alternativas eficazes para o controle do ciclo estral em ovinos, bem como apresentaram lacunas no conhecimento da dupla inseminação, e no uso das gonadotrofinas, abrindo margem para a realização de novos estudos.

Com relação aos resultados do terceiro estudo, foi observado que a realização da dupla IATF é viável, visto que a sua aplicação aumenta a taxa de prenhez, quando comparada a IATF única. Além disso, foi possível observar que a dose de 125 µg de cloprostenol, administrada na remoção do DIV em protocolo de curta duração com progestágeno, é eficiente para promover a sincronização do estro, proporcionando taxas de concepção e prenhez aceitáveis e reduzindo o volume injetado e o custo do protocolo. Já a determinação da curva de disponibilidade da hCG podem ser relevantes para a utilização desta gonadotrofina em diferentes finalidades. Novos estudos serão realizados para determinar doses e momentos mais adequados para aplicação da hCG para indução da ovulação nos protocolos de sincronização do estro em ovelhas.

## Referências

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, vol. 130, nº 3–4, p. 173–179, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>.

ABECIA, José A.; FORCADA, Fernando; GONZÁLEZ-BULNES, Antonio. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, vol. 27, nº 1, p. 67–79, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.001>.

ABRIL-PARREÑO, L.; KROGENÆS, A. K.; BYRNE, C. J.; DONOVAN, A.; STUEN, S.; CALDAS, E.; DISKIN, M.; DRUART, X.; FAIR, S. Ewe breed differences in cervical anatomy and cervicovaginal mucus properties: An international study. **Theriogenology**, vol. 160, p. 18–25, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.038>.

ACRITOPOULOU-FOURCROY, Stella; PAPPAS, V; PECLARIS, G; ZERVAS, N; SKOUFIS, V. Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2alpha or the prostaglandin analogue, ICI 80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. **Reproduction. Nutrition, Development**, vol. 22, nº 2, p. 345–354, 1982. <https://doi.org/10.1051/rnd:19820305>.

ALVARADO-ESPINO, A. S.; MEZA-HERRERA, C. A.; CARRILLO, E.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V. H.; GUILLEN-MUÑOZ, J. M.; ÁNGEL-GARCÍA, O.; MELLADO, M.; VÉLIZ-DERAS, F. G. Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. **Animal Reproduction Science**, vol. 167, p. 133–138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.019>.

ALVAREZ, Mercedes; ANEL-LOPEZ, Luis; BOIXO, Juan Carlos; CHAMORRO, Cesar; NEILA-MONTERO, Marta; MONTES-GARRIDO, Rafael; PAZ, Paulino da; ANEL, Luis. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 54, nº 4, p. 32–40, 2019. <https://doi.org/10.1111/rda.13523>.

AMER, P R; MCEWAN, J C; DODDS, K G; DAVIS, G H. Economic values for ewe prolificacy and lamb survival in New Zealand sheep. **Livestock Production Science**, vol. 58, p. 75–90, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00192-4](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00192-4).

BAIRD, D T; SCARAMUZZI, R J. Prostaglandin F2 $\alpha$  and luteal regression in the ewe: comparison with 16 aryloxyprostaglandin (I. C. I. 80, 996). **Annales de biologie animale, biochimie, biophysique**, vol. 15, nº 2, p. 161–174, 1975. <https://doi.org/10.1051/rnd:19750203>.

BRUNO-GALARRAGA, Macarena; CANO-MORENO, Virginia; LAGO-CRUZ, Beatriz; ENCINAS, Teresa; GONZALEZ-BULNES, Antonio; MARTINEZ-ROS, Paula. The use of hcg for inducing ovulation in sheep estrus synchronization impairs ovulatory follicle growth and fertility. **Animals**, vol. 11, n° 4, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11040984>.

BURUTARAN, M.; FIERRO, S.; NEGRÍN, F.; MINTEGUIAGA, M.; GIL, J.; OLIVERA-MUZANTE, J. Estrous, ovulation and reproductive responses of ewes synchronized with a long interval prostaglandin-based protocol for timed AI. **Theriogenology**, vol. 214, p. 187–191, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.027>.

CARATY, Alain; SKINNER, Donal C. Progesterone Priming Is Essential for the Full Expression of the Positive Feedback Effect of Estradiol in Inducing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Surge in the Ewe. **Endocrinology**, vol. 140, n° 1, p. 165–170, 1999. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6444>.

CUETO, M. I.; BRUNO-GALARRAGA, M. M.; FERNANDEZ, J.; FIERRO, S.; GIBBONS, A. E. Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. **Animal Reproduction Science**, vol. 221, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106597>.

CURNOCK, R M; REED, H C B; LOGUE, D N; MAXWELL, W M C. Artificial Insemination of Ewes with Ram Semen Frozen by the Pellet Method. **Proceedings of the British Society of Animal Production (1972)**, vol. 1984, p. 100–100, 1984. <https://doi.org/10.1017/s0308229600014562>.

D'AVILA, C. A.; DE MORAES, F. P.; BOHN, A. P.; ROVANI, M. T.; VIEIRA, A. D.; FERREIRA, Rogério; SALES, J. N. S.; BALDASSARRE, Hernan; MONDADORI, R. G.; GONÇALVES, P. B. D.; GASPERIN, B. G. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrous ewes. **Livestock Science**, vol. 265, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105070>.

DE LIMA, R. S.; MARTINS, T.; LEMES, K. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI. **Theriogenology**, vol. 154, p. 128–134, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.036>.

DEHKORDI, Reza Solymani; MIRZAEI, Abdolah; BOOSTANI, Alidad. Reproductive efficiency of treated Karakul ewes with short-term progesterone and hCG injections during the non-breeding and breeding seasons. **Animal Reproduction Science**, vol. 239, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106969>.

DIAS, J. H.; GONÇALVES, J. D.; ARRAIS, A. M.; BATISTA, R. I.T.P.; SOUZA-FABJAN, J. M.G.; BASTOS, R.; SIQUEIRA, L. G.B.; OLIVEIRA, M. E.F.; FONSECA, J. F. Single dose of 300 IU hCG in the early luteal phase in superovulated ewes: Effects on corpora lutea, progesterone profile, and embryo recovery. **Animal Reproduction Science**, vol. 247, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107101>.

DIAS, L. M.K.; SALES, J. N.S.; VIAU, P.; BARROS, M. B.P.; NICOLAU, S. S.; SIMÕES, L. M.S.; ALVES, N. G.; ALONSO, M. A.; VALENTIM, R.; OLIVEIRA, C. A.

Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, vol. 70, nº 1, p. 122–130, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9679>.

DOGAN, I.; NUR, Z. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 4, p. 133–138, 2006. <https://doi.org/10.17221/5532-VETMED>

DUTT, R H; CASIDA, L E. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. **Endocrinology**, vol. 43, nº 4, p. 208–217, 1948. <https://doi.org/10.1210/endo-43-4-208>.

FAIR, S; MEADE, K G; REYNAUD, K; DRUART, X; DE GRAAF, S P. The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix. **Reproduction**, vol. 158, p. 1–13, 2019. <https://doi.org/10.1530/rep-18-0595>.

FAO, 2021. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. FAOSTAT AGRICULTURE. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>> Acesso em: 12 mai. 2023.

FERNANDEZ, J.; BRUNO-GALARRAGA, M. M.; SOTO, A. T.; DE LA SOTA, R. L.; CUETO, M. I.; LACAU-MENGIDO, I. M.; GIBBONS, A. E. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. **Theriogenology**, vol. 126, p. 63–67, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.008>.

FIERRO, Sergio; GIL, Jorge; VIÑOLES, Carolina; OLIVERA-MUZANTE, Julio. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology**, vol. 79, nº 3, p. 399–408, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.022>.

FUKUI, Yutaka; YAMAMOTO, Yasunari; GODA, Shuzo; ONO, Hitoshi. Single or Double Inseminations at Fixed-Time Basis on Lambing Rate of Ewes Treated with Progestogen-Impregnated Intravaginal Sponges during the Non-Breeding Season. **Japanese journal of animal reproduction**, vol. 37, nº 3, p. 231–235, 1991. <https://doi.org/10.1262/jrd1977.37.231>.

GAROUSI, M. T.; MAVADATI, O.; BAHONAR, M.; RAGH, M. J. The effect of medroxyprogesterone acetate with or without eCG on conception rate of fat-tail ewes in out of breeding season. **Tropical Animal Health and Reproduction**, vol. 52, p. 1617–1622, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02159-8>.

GIBBONS, Alejandro Eduardo; FERNANDEZ, Jimena; BRUNO-GALARRAGA, María Macarena; SPINELLI, María Victoria; CUETO, Marcela Isabel. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction**, vol. 16, nº 4, p. 803–809, 2019. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>.

GIZAW, S.; TEGEGNE, A. Bio-economic and operational feasibility of introducing oestrus synchronization and artificial insemination in simulated smallholder sheep

breeding programmes. **Animal**, vol. 12, n° 7, p. 1517–1526, 2018. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003032>.

HACKETT, A. J.; LANGFORD, G. A.; ROBERTSON, H. A. Fertility of ewes after synchronization of estrus with prostaglandin f<sub>2</sub>α and artificial insemination. **Theriogenology**, vol. 15, n° 6, p. 599–603, 1981. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(81\)90063-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(81)90063-7).

HAENLEIN, G. F.W. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, vol. 84, n° 9, p. 2097–2115, 2001. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74655-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74655-3).

HANSEL, William; CONVEY, Edward M. Physiology of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, vol. 57, n° suppl\_2, p. 404–424, 1983. [https://doi.org/10.2527/animalsci1983.57Supplement\\_2404x](https://doi.org/10.2527/animalsci1983.57Supplement_2404x).

HAMEED, Nasir; KHAN, Muhammad Irfan-your-Rehman; ZUBAIR, Muhammad; ANDRABI, Syed Murtaza Hassan. Approaches of estrous synchronization in sheep: developments during the last two decades: a review. **Tropical animal health and production**, vol. 53, n°5, p. 485, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02932-8>.

HARESIGN, W; ACRIPOPOULOU, S A. Controlled breeding in sheep using the prostaglandin analogue, ICI 80996. **Livestock Production Science**, vol. 5, p. 313–319, 1978. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(78\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0301-6226(78)90059-3).

HASHIM, Noor Hashida; SYAFNIR; SEMBIRING, Meriksa. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. **Biomedical Research**, vol. 24, n° 1, p. 7–12, 2013.

IBGE, 2023. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. Disponível em:< <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 20 dez. 2023.

ISMAYA; SOETIMBOEL, M. Effects of Breed of Sire and Double Insemination on Performance of Reproduction of Local Sheep. **Bulletin of Animal Science**, p. 263–266, 1995. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v0i-.5088>.

JHA, Pankaj Kumar; ALAM, Md. Golam Shahi; MANSUR, Md. Abdullah Al; TALUKDER, Mohammad Rafiqul Islam; NAHER, Nazmun; RAHMAN, A. K. M. Anisur; HALL, David C.; BARI, Farida Yeasmin. Effects of number of frozen-thawed ram sperm and number of inseminations on fertility in synchronized ewes under field condition. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, vol. 35, n° 2, p. 190–197, 2020. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.2.190>.

KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., KARATZAS, G., BROZOS, C. Effect of time of artificial insemination on fertility of progestagen and PMSG treated indigenous Greek ewes, during non-breeding season. **Small Ruminant Research**, v. 39, n. 1, p. 67–71, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(00\)00170-x](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(00)00170-x).

KINSER, A R; GIBSON, M F; VINCE, D L; SCHEFFRAHN, N S; KESLERA' F, D J. Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone, PMS, hCG and(or) GnRH. **Theriogenology**, vol. 19, n° 3, p. 449–464, 1983. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90101-2).

KITTOK, R J; STELLFLUG, J N; LOWRY, S R. Enhanced progesterone and pregnancy rate after gonadotropin administration in lactating ewes. **Journal of Animal Science**, vol. 56, n° 3, p. 652–655, 1983. <https://doi.org/10.2527/jas1983.563652x>.

LANGFORD, G A. Influence of body weight and number of inseminations on fertility of progesterone-treated ewe lambs raised in controlled environments. **Journal of Animal Science**, vol. 62, n° 4, p. 1058–1062, 1986. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6241058x>.

LANGFORD, G A. Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progesterone-treated sheep in confinement. **Journal of Animal Science**, vol. 54, n° 6, p. 1205–1211, 1982. <https://doi.org/10.2527/jas1982.5461205x>.

LANGFORD, G A; AINSWORTH, L; WOLYNETZ, M S. Reproductive response of progesterone-treated sheep in confinement to a single and double insemination. **Journal of Animal Science**, vol. 54, n° 1, p. 12–17, 1982. <https://doi.org/10.2527/jas1982.54112x>.

LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J.; BATRA, T. R. Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progesterone-treated sheep. **Journal of Animal Science**, vol. 57, n° 2, p. 307–312, 1983. <https://doi.org/10.2527/jas1983.572307x>.

LAPTHORN, A. J.; HARRIS, D. C.; LITTLEJOHN, A.; LUSTBADER, J. W.; CANFIELD, R. E.; MACHIN, K. J.; MORGAN, F. J.; ISAACS, N. W. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature**, vol. 369, p. 455–461, 1994. <https://doi.org/10.1038/369455a0>.

LASTER, Danny B; GLIMP, Hudson A. Influence of breed on response to exogenous hormones in estrous and anestrous ewes. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 1129–1135, 1974. <https://doi.org/10.2527/jas1974.3961129x>.

LOUBSER, P G; VAN NIEKERK, C H. Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. **Theriogenology**, vol. 15, n° 6, p. 547–552, 1981. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(81\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(81)90057-1).

MARTINEZ-ROS, Paula; GONZALEZ-BULNES, Antonio. Efficiency of cidr-based protocols including gnrh instead of ecg for estrus synchronization in sheep. **Animals**, vol. 9, n° 4, 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9040146>.

MARTINEZ-ROS, Paula; RIOS-ABELLAN, Alejandro; GONZALEZ-BULNES, Antonio. Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on

appearance of estrus behavior, ovulatory success and fertility in sheep. **Animals**, vol. 9, nº 1, 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9010009>.

MENCHACA, A; MILLER, V; GIL, J; PINCZAK, A; LACA, M; RUBIANES, E. Prostaglandin F2a Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 39, nº 5, p. 352–355, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00527.x>.

MENCHACA, A; PINCZAK, A; QUEIROLO, D. Storage of ram semen at 5 °C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. **Animal Reproduction**, vol. 2, nº 3, p. 195–198, 2005.

MENCHACA, Alejo; RUBIANES, Edgardo. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, vol. 16, nº 4, p. 403–413, 2004. <https://doi.org/10.1071/RD04037>.

MUÑOZ, Camila M.; PARRAGUEZ G, Víctor H.; LATORRE, Etel V. Efecto del tiempo de inseminación artificial después de la detección de celo sobre la tasa de preñez en ovinos corriedale. **Agricultura Técnica**, vol. 62, nº 4, p. 613–623, 2002. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072002000400013>.

NASCIMENTO, A. B.; BENDER, R. W.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; ARAUJO, R. R.; GUENTHER, J. N.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 96, nº 5, p. 2873–2882, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5895>.

OLIVEIRA, Maria Emilia Franco; BARLEWSKI, Pawel Mieczyslaw; FELICIANO, Marcus Antônio Rossi. Controle do Ciclo estral. *In*: OLIVEIRA, Maria Emilia Franco; TEIXEIRA, Pedro Paulo Maia; VICENTE, Wilter Ricardo Russiano (orgs.). **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. 1º ed. São Paulo: Editora Med Vet, 2013. p. 71–90.

OLIVERA-MUZANTE, J.; FIERRO, S.; LÓPEZ, V.; GIL, J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, vol. 75, nº 7, p. 1232–1238, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.036>.

PALACIOS, Carlos; ABECIA, José A.; PLAZA, Javier; HIDALGO, Cristina; DE LA FUENTE, Luis F. Efficiency of Artificial Insemination at Natural Estrus in Organic Churra Ewes. **Veterinary Sciences**, vol. 9, nº 7, p. 370, 2022. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070370>.

PAULENZ, Heiko; SÖDERQUIST, Lennart; ÅDNØY, Tormod; FOSSEN, Ove Harald; BERG, Kjell Andersen. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. **Theriogenology**, vol. 60, nº 4, p. 759–766, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00048-7).

PENNA, Bruno; LIBONATI, Hugo; DIRECTOR, Ariel; SARZEDAS, Ana Clara; MARTINS, Gabriel; BRANDÃO, Felipe Z.; FONSECA, Jeferson; LILENBAUM,

Walter. Progestin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. **Animal Reproduction Science**, vol. 142, n° 1–2, p. 71–74, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.006>.

PEREIRA, Raquel Grande; PIRES, Otávio Saraiva; HOEFLE, Clério Antônio; FRITZEN, Alexandre; FIORDALISI, Giovanna; FERST, Juliana Germano; DE OLIVEIRA, Fernando Caetano; VIEIRA, Arnaldo Diniz; MONDADORI, Rafael Gianella; MAGGI, Gabriel; ROVANI, Monique Tomazele; GASPERIN, Bernardo Garziera; GONÇALVES, Paulo Bayard; FERREIRA, Rogério. GnRH analogs induce a LH peak and increase pregnancy per timed-AI in ewes. **Theriogenology**, vol. 215, p. 132–137, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.003>.

RE, G; BADINO, P; NOVELLI, A; VALLISNERIT, A; GIRARDI, C; OZZANO EMILIA, P; BOLOGNA, Italy; VALLISNERI, Badino P; GIRARDI, A. Specific binding of d-cloprostenol and d-cloprostenol to PG F<sub>2</sub> receptors in bovine corpus luteum and myometrial cell membranes. **I. vet. Pharmacol. Therap**, vol. 17, p. 455–458, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1994.tb00277.x>.

REKIK, M.; HAILE, A.; ABEBE, A.; MULUNEH, D.; GOSHME, S.; BEN SALEM, I.; HILALI, M. El Dine; LASSOUED, N.; CHANYALEW, Y.; RISCHKOWSKY, B. GnRH and prostaglandin-based synchronization protocols as alternatives to progestogen-based treatments in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 51, n° 6, p. 924–929, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12761>.

REYNA, J., THOMSON, P. C., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. Synchrony of ovulation and follicular dynamics in Merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 410–417, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00800.x>.

ROY, François; COMBES, Bruno; VAIMAN, Daniel; CRIBIU, Edmond P; POBEL, Thierry; DELÉTANG, François; COMBARNOUS, Yves; GUILLOU, Florian; MAUREL, Marie-Christine. Humoral Immune Response to Equine Chorionic Gonadotropin in Ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and Interference with Subsequent Fertility. **Biology of Reproduction**, vol. 61, p. 209–218, 1999. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.209>.

RUBIANES, E., UNGERFELD, R., VIÑALES, C., RIVERO, A., ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1479–1488, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00155-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00155-6).

SALAMON, S. Fertility following Deposition of Equal Numbers of Frozen-thawed Ram Spermatazoa by Single and Double Insemination. **Australian Journal of Agricultural Research**, vol. 28, n° 3, p. 477–479, 1977. <https://doi.org/10.1071/AR9770477>.

SALAMON, S. Fertility of ram spermatazoa following pellet freezing on dry ice at -79 and -140°C\*. **Aust. J. biol. Sci**, vol. 24, p. 183–185, 1971. <https://doi.org/10.1071/bi9710183>.

SALAMON, S; LIGHTFOOT, R J. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. **Journal of reproduction and fertility**, vol. 22, p. 409–423, 1970. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0220409>.

SALAMON, S; MAXWELL, WMC; FIRTH, JH. Fertility of ram semen after storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, vol. 2, p. 373–385, 1979. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(79\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(79)90024-1).

SALEH, M.; SHAHIN, M.; WUTTKE, W.; GAULY, M.; HOLTZ, W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). **Reproduction**, vol. 144, nº 1, p. 77–81, 2012. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0093>.

SANTOS-JIMENEZ, Zurisaday; MARTINEZ-HERRERO, Claudia; ENCINAS, Teresa; MARTINEZ-ROS, Paula; GONZALEZ-BULNES, Antonio. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 55, p. 882–884, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anire>.

SIMONETTI, Laura; LYNCH, Gloria María; CORMICK, Mercedes Mc. Fixed-time artificial insemination in dairy ewes raised in field conditions in Argentina. **Acta Veterinaria Brasilica**, nº 1, p. 54–59, 2014. <https://doi.org/10.21708/avb.2014.8.1.3577>

SIMONETTI, Laura; RAMOS, Guillermo; GARDÓN, Juan Carlos. Effect of estrus synchronization and artificial insemination on reproductive performance of Merino sheep Efeitos da sincronização do estro e da inseminação artificial sobre a performance reprodutiva de ovelhas Merino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. 39, nº 3, p. 143–146, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000300006>.

SMITH, P A; BOLAND, M P; GORDON, I. Conception rate in ewes: effect of method of breeding and number of inseminations. **J. agric. Sci., Camb**, vol. 91, p. 511–512, 1978. <https://doi.org/10.1017/S0021859600046645>.

SOUZA, Carlos José Hoff; CHAGAS, Lúcia Martins; MOURA, Adilson; MORAES, José Carlos Ferrugem. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. **Ciência Rural**, vol. 25, nº 2, p. 277–281, 1995. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781995000200018>.

SUÁREZ, G.; ZUNINO, P.; CAROL, H.; UNGERFELD, R. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, vol. 63, nº 1–2, p. 39–43, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.01.011>.

TEXEIRA, Tarcísio Alves; DA FONSECA, Jeferson Ferreira; DE SOUZA-FABJAN, Joanna Maria Gonçalves; DE REZENDE CARVALHEIRA, Luciano; DE MOURA FERNANDES, Daniel Andrews; BRANDÃO, Felipe Zandonadi. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep.

**Tropical Animal Health and Production**, vol. 48, nº 3, p. 545–551, 2016.  
<https://doi.org/10.1007/s11250-015-0989-y>.

UNGERFELD, R; RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, vol. 46, nº 1, p. 63–66, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00105-0).

VASCONCELOS, Carlos Otávio de Paula; BRANDÃO, Felipe Zandonadi; MARTINS, Gabriel; PENNA, Bruno; SOUZA-FABIAN, Joanna Maria Gonçalves de; LILENBAUM, Walter. Análise qualitativa e quantitativa de bactérias da vaginite associadas com implante intravaginal em ovelhas após sincronização de estro. **Ciencia Rural**, vol. 46, nº 4, p. 632–636, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150365>.

VIANA, J.G.A; WAQUIL, P.D. Ovinocultura no Rio Grande do Sul e Uruguai: uma análise institucional e evolucionária da trajetória econômica. In: INSTITUIÇÕES, REGRAS E HÁBITOS: PROPOSIÇÕES TEÓRICAS E APLICADAS PARA ESTUDOS RURAIS. Curitiba: Editora CRV, 2020. p. 201–230.

VILANOVA, Xavier Manteca; DE BRIYNE, Nancy; BEAVER, Bonnie; TURNER, Patricia V. Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. **Animals**, vol. 9, 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9121053>.

VIÑALES, C; FORSBERG, M; BANCHERO, G; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, vol. 55, p. 993–1004, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00460-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00460-5).

VIÑALES, Carolina; RUBIANES, Edgardo. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. **Canadian Journal of Animal Science**, vol. 78, nº 3, p. 429–431, 1998. <https://doi.org/10.4141/A98-015>.

VISSER, D; SALAMON, S. Fertility following Inseminations with Frozen-Thawed Reconcentrated and Unconcentrated Ram Semen. **Aust. J. Biol. Sci.**, vol. 27, p. 423–425, 1974. <https://doi.org/10.1071/bi9740423>.

VISSER, D; SALAMON, S. Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris-based diluent. **Aust. J. Biol. Sci.**, vol. 26, p. 513–516, 1973. <https://doi.org/10.1071/bi9730513>.

YOUNG, J. M.; TROMPF, J.; THOMPSON, A. N. The critical control points for increasing reproductive performance can be used to inform research priorities. **Animal Production Science**, vol. 54, nº 6, p. 645–655, 2014.  
<https://doi.org/10.1071/AN13269>.

ZELEKE, M.; GREYLING, J. P.C.; SCHWALBACH, L. M.J.; MULLER, T.; ERASMUS, J. A. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, vol. 56, nº 1–3, p. 47–53, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.12.006>.

## **Anexos**

# Anexo A - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

SEI/UFPEL - 2126808 - Parecer

13/04/2023 13:30



PARECER N° 58/2023/CEUA/REITORIA  
PROCESSO N° 23110.006185/2023-19

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação em fêmeas ovinas", registrada com o n° 23110.006185/2023-19, sob a responsabilidade de **Rafael Gianella Mondadori** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas em reunião de 13/04/2023.

| Finalidade              | ( x ) Pesquisa ( ) Ensino  |
|-------------------------|--|
| Vigência da autorização | Início: 30/04/2023 Término: 31/12/2025   |
| Espécie/linhagem/raça   | <i>Ovis aries</i>  |
| N° de animais           | 1.316 (1.194 fêmeas e 122 machos)  |
| Idade                   | 1 a 8 anos   |
| Sexo                    | Fêmeas e machos  |
| Origem                  | Serão utilizados animais do Centro Agropecuário da Palma da UFPEL, localizada na BR116, KM 537, Capão do Leão, Brasil, e de propriedades rurais parceiras. |

[https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_i...cd40bdc940508a1636ebb5a31c0423c1e021770a861ee377829fd0f07c86](https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_i...cd40bdc940508a1636ebb5a31c0423c1e021770a861ee377829fd0f07c86) Página 1 de 2

SEI/UFPEL - 2126808 - Parecer

13/04/2023 13:30

Código para cadastro n° CEUA 006185/2023-19

Priscila Marques Moura de Leon  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON**, Professor do Magistério Superior, em 13/04/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2126808 e o código CRC 007D0AEA.

Referência: Processo nº 23110.006185/2023-19

SEI nº 2126808

PARECER Nº  
PROCESSO Nº

160/2020/CEEA/REITORIA  
23110.031587/2020-17

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Alternativas para o controle do ciclo estral de bovinos e ovinos.**”, registrada com o nº 23110.031587/2020-17, sob a responsabilidade de **Rafael Gianella Mondadori** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 08 de dezembro de 2020.

| Finalidade                | ( x ) Pesquisa ( ) Ensino  |
|---------------------------|--|
| Vigência da autorização   | 01/01/2021 a 30/12/2025  |
| Espécie/linhagem/raça     | <i>Ovis aries</i> – raças comerciais e cruzas<br><i>Bos taurus</i> – raças comerciais e cruzas |
| Nº de animais             | 486 ovinos<br>688 bovinos  |
| Idade                     | ovinos - 12 a 60 meses<br>bovinos - 12 a 96 meses  |
| Sexo                      | ovinos - 26 machos e 460 fêmeas<br>bovinos - 688 fêmeas  |
| Origem                    | Centro Agropecuário da Palma - UFPel   |
| Propriedades particulares |  |

Código para cadastro nº CEEA 31587-2020

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário, em 16/12/2020, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1158071 e o código CRC F7CD04A5.