



Inseminação artificial a tempo fixo em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana: efeito da ponta DARIO

Daiane Moreira Silva¹, Hélder Miranda Pires Quintas², Liliana Maria Sampaio dos Santos³, Armindo de Carvalho Neves Álvaro⁴, Paulo Jorge Pereira Afonso⁵ e Ramiro Corujeira Valentim⁶

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Machado, CEP 37750-000, Brasil. Professora de Zootecnia, daiane.moreira@ifsuldeminas.edu.br

²CIMO, Instituto Politécnico de Bragança, 5300-253 Bragança, Portugal. Professor adjunto, helder5tas@ipb.pt

³Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. Técnica superior, lilianasantos@ipb.pt

⁴Instituto Superior Politécnico do Kwanza Sul, Sumbe, Kwanza Sul, Angola. Professor adjunto, acna1665@hotmail.com

⁵Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. Professor convidado, afonso@ipb.pt

⁶Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. Professor coordenador, valentim@ipb.pt

Recebido em: 05/08/2022

Aceito em: 27/09/2022

Resumo

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito do dispositivo anti-refluxo para inseminação ovina (DARIO) sobre a taxa de fertilidade em ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana (CGB) inseminadas artificialmente a tempo fixo. Para o efeito foram utilizadas 81 ovelhas com idades compreendidas entre um e cinco anos. No fim de abril de 2021, procedeu-se ao controlo reprodutivo das ovelhas, recorrendo a um tratamento progestagénico curto (cinco dias) + gonadotrofina coriônica equina (eCG). A inseminação artificial (IA) cervical foi feita a tempo fixo (55 horas pós-término do tratamento hormonal), com sêmen refrigerado. Todas as ovelhas foram inseminadas pelo mesmo inseminador: 39 ovelhas com a extremidade da bainha coberta com a ponta anti-refluxo DARIO e as demais 42 sem esta ponta. O diagnóstico de gestação foi feito por ecografia, 41 dias pós-IA. A idade e a condição corporal (CC) não condicionaram a resposta das ovelhas ao tratamento hormonal aplicado nem a taxa de fertilidade. Cerca de 95,1% das ovelhas responderam ao tratamento progestagénico + eCG. Quarenta e um dias pós-IA, 86,4% das ovelhas estavam gestantes. O uso da ponta DARIO não afetou a taxa de fertilidade.

Palavras-chave: Gestação. Ovinocultura. Reprodução.

Introdução

Nos ovinos, uma das principais barreiras à difusão da técnica de inseminação artificial (IA) é a anatomia do cérvix (SAYRE; LEWIS, 1997, SALAMON; MAXWELL, 2000, STELLFLUG et al., 2001, KERSHAW et al., 2005, MACÍAS et al., 2020 e PERA, 2020), que dificulta a deposição profunda da dose seminal no trato genital feminino (SAYRE; LEWIS, 1997, STELLFLUG et al., 2001, KERSHAW et al., 2005, FERRA; SERENO, 2006, KAABI et al., 2006 e MACÍAS et al., 2020). O tamanho e a forma do canal cervical (formato de “Os”) condicionam a introdução do pistolete de inseminação (MCKUSICK et al., 1998, STELLFLUG et al., 2001, FERRA; SERENO, 2006, KAABI et al., 2005, LEETHONGDEE et al., 2010, LIMA,

2010 e CANDAPPA; BARTLEWSKI, 2011) e podem determinar a ocorrência de refluxo cervical (STEYN, 2003, BICUDO, 2005 e FERRA; SERENO, 2006).

As ovelhas que produzem refluxo cervical possuem taxas de fertilidade mais baixas (CANDAPPA; BARTLEWSKI, 2011 e MORRELL, 2011), pelo que este deve ser evitado (CSEH; FAIGL, 2012; AMIRIDIS, 2012, DENDENA, 2017 e FORNAZARI, 2018), particularmente quando é abundante (DENDENA, 2017). A fim de reduzir o refluxo cervical pós-IA cervical, foi criada o dispositivo anti-refluxo para inseminação ovina (DARIO), que permite uma penetração ligeira do canal cervical (MACÍAS et al., 2017), prevenindo a ocorrência de refluxo cervical (HUMECO, 2020). A utilização desta ponta

aumenta os custos de IA em 4,31% por ovelha (MACÍAS et al., 2017), porém, ela resulta no aumento das taxas de fertilidade (MACÍAS et al., 2017, 2020).

Material e métodos

Este trabalho foi realizado em Bragança, Portugal, na Quinta do Pinheiro Manso (41° 48' 33"N, 6° 44' 3"W e altitude 670 metros), pertencente à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA-IPB), entre 20 de abril e 15 de junho de 2021.

Animais

Neste trabalho, foram utilizadas 81 ovelhas da raça Churra Galega Bragançana (CGB), com idades compreendidas entre um e cinco anos. A última parição havia ocorrido cerca de seis meses antes.

As ovelhas foram alimentadas em pastoreio de prados naturais e suplementadas, em grupo, com feno de prados naturais (*ad libitum*) e 300 a 350 g diários por ovelha de alimento concentrado comercial. Nos 30 dias seguintes à IA, manteve-se o aporte energético/proteico da dieta.

Este ensaio teve início com a determinação da condição corporal das ovelhas, segundo a tabela de classificação de Russel, Doney e Gunn (1969). Foram considerados intervalos de 0,25 pontos.

Figura 1 – Pontas DARIO (esquerda) e pistoletes de IA preparados com e sem ponta DARIO (direita).



Tratamento de controlo reprodutivo

No dia 30 de abril de 2021, as ovelhas receberam uma esponja vaginal impregnada com 20 mg de progesterona (FGA) (Chrono-Gest®, Intervet, Portugal). Na mesma altura, elas foram injetadas intramuscularmente (i.m.) com 100 µg de Cloprostenol (Estrumate®, MSD Animal Health, Portugal). O tratamento progestagénico teve a duração de cinco dias.

Quando da remoção da esponja vaginal (5 de maio de 2021), as ovelhas foram injetadas i.m. com 500 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Intergonan®, Intervet, Portugal).

Resposta ao tratamento de controlo reprodutivo

Com o intuito de identificar a formação do primeiro corpo lúteo (CL) pós-tratamento FGA + eCG, nos cinco dias pós-administração de eCG, procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para determinação dos níveis plasmáticos de FGA através da técnica de radioimunoensaio (RIA). Para o efeito, utilizou-se um leitor de cintilações DPC® Gamma C12 (Bertholt Technologies, Bad Wildbad, Alemanha) e kits da DiaSource® (ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respetivamente, de 7,8 e 15,1%.

Considerou-se que o primeiro CL havia se formado quando os níveis plasmáticos de FGA ultrapassaram, pela primeira vez, os 0,5 ng mL⁻¹.

Recolha de sémen

O sémen foi recolhido com o auxílio de um electroejaculador (eProvac®, Minitüb, modelo MT, Tiefenbach, Alemanha). Foram recolhidos ejaculados de carneiros adultos (três a sete anos de idade) da raça CGB, que já não ejaculavam havia três dias.

Feitas as colheitas dos ejaculados, os tubos colectores foram transportados para laboratório, onde foram mantidos a 37°C em banho-maria

refrigerado (Neslab® RTE 221, Newington, EUA). No mesmo equipamento, foi previamente conservado o diluidor seminal Andromed® (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha).

Análises seminais

O volume foi medido através da graduação existente nos tubos coletores. A concentração espermática e a motilidade dos espermatozoides foram estimadas com o auxílio de um sistema CASA da Minitube (Androvision®, Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). A percentagem de espermatozoides vivos foi determinada com recurso a um microscópio trinocular (Motic BA-310, Barcelona, Espanha) de contraste de fase, depois de diluir uma gota de sémen com duas gotas de eosina e de preparar um esfregaço (foram contados 200 espermatozoides).

Os ejaculados utilizados tinham volume $\geq 2,0$ ml, concentração espermática $\geq 3,0 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} , motilidade espermática $\geq 75\%$ e percentagem de espermatozoides vivos $\geq 75\%$.

Doses seminais

Depois de realizadas as análises seminais, cada ejaculado foi inicialmente diluído (na proporção 1:1) com Andromed, e o volume foi acertado com os valores indicados pelo programa Androvision. Em seguida, a temperatura do sémen diluído foi reduzida, durante cerca de 90 minutos, de 37°C para 15°C (Neslab® RTE 221, Newington, EUA). No final, após 10 minutos de repouso, este foi aspirado para palhetas de 0,25 mL, que foram seladas com pó polivinílico. Entre o término do processo de refrigeração e o começo da IA, passaram-se cerca de 30 minutos.

Cada palheta de sémen continha, pelo menos, 350×10^6 espermatozoides.

Inseminação artificial a tempo fixo

Todas as ovelhas foram inseminadas (7 de maio de 2021), independentemente de

terem manifestado cio, 55 horas depois da administração de eCG, pelo mesmo inseminador. Para o efeito, ele utilizou um espéculo vaginal da IMV (L'Aigle, França), pistoletes Quicklock® (Minitube, Tiefenbach, Alemanha) e bainhas Minitub® (Tiefenbach, Alemanha). Trinta e nove ovelhas foram inseminadas depois de colocar uma ponta anti-refluxo DARIO (Humeco, Huesca, Espanha) na extremidade das bainhas Minitub® (Figura 1). As demais 42 ovelhas foram inseminadas sem esta ponta.

A inseminação foi feita no estábulo com as ovelhas em estação. Para facilitar a observação do cérvix e para maior comodidade do inseminador, dois membros da equipa levantaram os membros posteriores das ovelhas, mantendo, no entanto, os membros anteriores sempre em contacto com o solo.

A deposição do sémen foi feita sempre o mais profundamente possível, sem, no entanto, forçar a passagem do pistolete pelo canal cervical.

Diagnóstico de gestação

Quarenta e um dias após a IA (15 de junho), procedeu-se ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet e de uma sonda rectal multifrequência de 5,0-10,0 MHz.

Análise estatística

No sentido de identificar diferenças estatisticamente significativas entre alguns parâmetros, efetuaram-se análises de variância (STEEL; TORRIE, 1980). A comparação entre médias realizou-se segundo o teste de Bonferroni-Dunn (DUNN, 1961). Com o intuito de comparar frequências utilizou-se o teste de qui-quadrado (χ^2) (SNEDECOR; COCHRAN, 1980).

Resultados e discussão

No início deste trabalho, as ovelhas CGB tinham, em média, $3,2 \pm 1,9$ anos de idade

(coeficiente de variação (CV) = 59,2%), sendo que a idade pode afetar a taxa de fertilidade pós-IA (SHACKELL et al., 1990, ANEL et al., 2005, ESMAILIZADEH et al., 2009, FORCADA, 2010, SANTOLARIA et al., 2011 e PALACÍN et al., 2012). Nas ovelhas nulíparas ou primíparas, a taxa de fertilidade é normalmente inferior à das ovelhas adultas (HALBERT et al., 1990, WINDSOR, 1995, PALACÍN et al., 2012 e FORNAZARI, 2018), porque elas tendem a produzir menos secreções cervicais e o transporte dos espermatozoides no seu trato genital é comprometido (PALACÍN et al., 2012). Nas ovelhas adultas, a taxa de fertilidade tende a aumentar com a idade (WINDSOR, 1995 e PALACÍN et al., 2012), até aos cinco anos (SANTOLARIA et al., 2011 e PALACÍN et al., 2012), aos seis anos (SHACKELL et al., 1990), ou aos sete anos (ESMAILIZADEH et al., 2009 e SANTOLARIA et al., 2011). Nas ovelhas mais velhas, a taxa de fertilidade tende a reduzir-se devido ao aumento do risco de ocorrência de problemas reprodutivos e à diminuição da qualidade dos oócitos ovulados (PALACÍN et al., 2012). No presente trabalho, a idade não afetou a taxa de fertilidade (probabilidade (P) > 0,05), possivelmente porque a maioria das ovelhas estudadas (71,6%) tinha entre dois e cinco anos.

As ovelhas CGB possuíam uma condição corporal (CC) média de $3,7 \pm 0,7$ pontos (CV = 20,0%). De acordo com Molina et al. (1994), a CC à cobertura pode condicionar a taxa de fertilidade. Segundo O'Brein (2002), Scaramuzzi e Martin (2008) e Karikari e Blasu (2009), a CC ideal das ovelhas à cobertura é de 2,5-3,5 pontos. Palacios (2010) e Valentim et al. (2015) referem valores de 3,0-4,0 pontos. No presente trabalho, a CC não influenciou a taxa de fertilidade (P > 0,05), provavelmente porque a maioria delas (93,8%) possuía uma CC de 2,5-4,5 pontos.

A diferença de idade entre ovelhas inseminadas com a ponta anti-refluxo DARIO ou

não (ponta DARIO: $3,2 \pm 1,9$ anos; sem ponta: $4,0 \pm 2,0$ anos) revelou-se não significativa (P > 0,05). No mesmo sentido, a diferença de CC entre ovelhas inseminadas com a ponta anti-refluxo DARIO ou não (ponta DARIO: $3,7 \pm 0,6$ pontos; sem ponta: $3,7 \pm 0,7$ pontos) mostrou-se não significativa (P > 0,05). Estes dados refletem a divisão aleatória das ovelhas por grupo.

Resposta ao tratamento FGA + eCG

Os tratamentos progestagénicos curtos, permitem evitar os efeitos negativos que os tratamentos progestagénicos longos têm sobre a atividade ovárica e a sobrevivência e a dinâmica dos espermatozoides no trato genital feminino (AZEVEDO et al., 2006, ABECIA et al., 2012, MATEUS, 2014, VALENTIM *et al.*, 2015 e SWELUM et al., 2018a,b). Ainda que mais caros, eles são muito eficazes (MATEUS, 2014, CONRADI, 2018, FORNAZARI, 2018). A administração de eCG melhora a taxa de sincronização de cios, a resposta ovárica satisfatória e a antecipação do momento da ovulação (RITAR et al., 1984 e OMONTESE et al., 2016). No presente trabalho, nos cinco dias pós-administração de eCG, 95,1% (n = 77) das ovelhas possuíam níveis plasmáticos de FGA superiores a $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$, ou seja, responderam ao tratamento aplicado. Resultados semelhantes foram observados por Mateus (2014), Conradi (2018), Fornazari (2018) e Pera (2020).

Nem a idade, nem a CC condicionaram a resposta das ovelhas ao tratamento hormonal aplicado (P > 0,05). Estes resultados podem ser explicados pelo facto da maioria delas terem uma idade e uma CC compatíveis com um bom desempenho reprodutivo.

Taxa de fertilidade pós-inseminação artificial

Quarenta e um dias após a IA, 86,4% (n = 70) das ovelhas estavam gestantes. Esta taxa de fertilidade revelou-se muito superior à média indicada na bibliografia para ovinos:

40-60% (ANEL et al., 2005 e MASOUDI et al., 2017), 50-65% (BARIL et al., 1993, AX et al., 2004 e VALENTIM et al., 2009) e 65-75% (COGNIÉ, 1988). Contudo, alguns autores referem valores de fertilidade igualmente elevados: 70-82% (DONOVAN et al., 2001, 2004), 74,5% (FORNAZARI, 2018), 82,2% (HILL et al., 1998; EHLING et al., 2003; KUKOVICS et al., 2011), 83,7% (PERA, 2020), 84,1% (CONRADI, 2018), 85,1% (DENDENA, 2017) e 80-90% (KUKOVICS et al., 2011).

As ovelhas que produzem refluxo cervical possuem taxas de fertilidade mais baixas (CANDAPPA; BARTLEWSKI, 2011 e MORRELL, 2011). De acordo com a informação da empresa Humeco, a ponta anti-refluxo DARIO permite uma penetração suficientemente profunda do canal cervical (MACÍAS et al., 2017, 2020), ao mesmo tempo que bloqueia a entrada do "Os" da cérvix, prevenindo o refluxo cervical de sêmen e melhorando a taxa de fertilidade em até 12% (HUMECO, 2022). No presente trabalho, o uso da ponta anti-refluxo DARIO não melhorou a taxa de fertilidade (ponta DARIO: 84,6%; sem ponta: 88,1%) ($\chi^2 = 0,4$; $P > 0,05$). Na verdade, ainda que a ponta anti-refluxo DARIO possa diminuir a incidência de refluxo cervical, ela por outro lado impede a deposição do sêmen além da primeira prega cervical, o que, em alguns casos, pode determinar uma redução da taxa de sucesso da IA.

Nos ovinos, a ocorrência de algum refluxo cervical é esperada, uma vez que o volume interno do cérvix pode ser inferior ao da dose seminal (0,25 mL) (CSEH 2012, FAIGL; AMIRIDIS, 2012). Na realidade, ele varia entre 0,1-0,3 mL (ANEL et al., 2006). A ponta anti-refluxo DARIO não permite ultrapassar este problema. Efetivamente, das ovelhas CGB inseminadas com esta ponta, 12,8% (n = 5) apresentou refluxo cervical. Ainda assim, 80% (n = 4) delas ficaram gestantes e 20% (n = 1) não gestantes ($\chi^2 = 72,0$; $P \leq 0,001$). Um refluxo cervical

ligeiro é compatível com a obtenção de uma boa taxa de fertilidade (DENDENA, 2017).

Conclusão

O uso da ponta anti-refluxo DARIO não afeta a taxa de fertilidade pós-IA em ovelhas CGB.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto 0687_OVISPID_2_E POCTEP – Programa de Cooperação Transfronteiriço Portugal-Espanha.

Referências

- ABECIA, J. A.; FORCADA F.; GONZALEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 173-179, 2012. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22325928/>. Accessed on: June 29, 2022.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ., P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. s2, p. 30-42, 2006. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x>. Accessed on: June 29, 2022.
- ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; DE LA FUENTE, L. F.; DE PAZ., P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235-1247, 2005. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04001876>. Accessed on: June 29, 2022.

AX, R., L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Barueri: Editora Manole, 2004. p. 381-394.

AZEVEDO, J. M.; VALENTIM, R. C.; CORREIA, T. M. Control hormonal de la actividad ovárica en ovinos. **Albéitar**, v. 98, s/n., p.6-8, 2006. Available at: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/5801/3/Albeitar%2098%20%28Setembro%2006%29%20Espanhol.pdf>. Accessed on: June 29, 2022.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; LEOEUF, B.; ORGEUR, P. E; VALLET, J.C. **Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins**. Roma: Étude FAO Production et Santé Animales, 1993. 193 p.

BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Science Veterinary**, v. 33, supl.1, p. 127-130, 2005. Available at: <https://docplayer.com.br/18563832-Aspectos-peculiares-da-inseminacao-artificial-em-ovinos.html>. Accessed on: June 29, 2022.

CANDAPPA, I. B. R.; BARTLEWSKI, P. M. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 162-175, 2011. Available at: <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TORSJ-3-162>. Accessed on: June 29, 2022.

COGNIÉ, Y. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. **INRA Productions Animales**, v. 1 n. 2, p. 83-92, 1988. Available at: [https://hal.](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00895819/document)

[archives-ouvertes.fr/hal-00895819/document](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00895819/document). Accessed on: June 29, 2022.

CONRADI, A. **Sincronização da actividade ovárica e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Efeitos da administração de melatonina exógena, de um tratamento progestagénico curto + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação do sémen**. 2018, p. 78. Dissertação (Mestrado). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3, p. 187-192, 2012. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012000401?via%3Dihub>. Accessed on: June 29, 2022.

DENDENA, M. W. **Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana**. 2017, p. 52. Dissertação (Mestrado). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrous. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 3-4, p. 359-368, 2004. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000326?via%3Dihub>. Accessed on: June 29, 2022.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; LALLY, T.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, G. P.; O'NEIL, D. J. AI for sheep using frozen-thawed semen. In: **ARMIS 4047 Project report, under the research stimulus fund**; OPARDF Measure 5b., Dublin, 44 p. 2001. Available at: https://www.researchgate.net/publication/242167475_AI_for_sheep_

using_frozen-thawed_semen. Accessed on: June 29, 2022.

DUNN, O. J. Multiple comparisons among means. **Journal of the American Statistical Association**, v. 56, n. 293, p. 52-64, 1961. Available at: https://sci2s.ugr.es/keel/pdf/algorithm/articulo/1961-Bonferroni_Dunn-JASA.pdf. Accessed on: June 29, 2022.

EHLING, C.; WIRTH, P.; SCHINDLER, L., HADELER, K.-G.; DÖPKE, H.-H.; LEMME, E.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen-thawed semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 777-787, 2003. Available at: <https://www.jstor.org/stable/2282330> Accessed on: June 29, 2022.

ESMAILIZADEH, A. K.; DAYANI, O.; MOKHTARI, M.S. Lambing season and fertility of fat-tailed ewes under an extensive production system are associated with liveweight and body condition around mating. **Animal Production Science**, v. 49, n. 12, 1086-1092, 2009. Available at: <https://www.publish.csiro.au/AN/AN09064>. Accessed on: June 29, 2022.

FERRA, J. DE C.; SERENO, J. R. B. **Inseminação artificial em ovinos**. Planaltina: EMBRAPA, 2006. Documento 156. 26 p.

FORCADA, F. Control de la actividad reproductiva mediante el tratamiento con melatonina. *In*: ABECIA, A. M.; FORCADA, F. **Manejo reproductivo en ganado ovino**. Saragoça: Editora Servet, 2010. p. 65-86.

FORNAZARI, R. **Controlo reproductivo e inseminação artificial com sémen fresco e refrigerado em ovelhas Awassi x Sarda em maio**: efeitos da administração de melatonina exógena, de tratamentos progestagênicos curtos, de diluidores seminais e de técnicas de

preservação do sémen. 2018. p. 89. Dissertação (Mestrado). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal.

HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S.; BUCKRELL, B. C. The structure of the cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v. 33, n. 5, p. 977-992, 1990. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X90900607>. Accessed on: June 29, 2022.

HILL, J. R.; THOMSON, J. A.; PERKINS, N.R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 697-709, 1998. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X98000193>. Accessed on: June 29, 2022.

HUMECO, 2022. **Aplicación. Punta inseminación DARIO**. Available at: <https://www.humeco.net/producto/punta-inseminacion-dario>. Accessed on: June 29, 2022.

KAABI, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; CHAMORRO, C. A.; BOIXO, J. C.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1876-1883, 2006. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X06002895> Accessed on: June 29, 2022.

KARIKARI, P. K.; BLASU, E. Y. Influence of nutritional flushing prior to mating on the performance of West African Dwarf goats mated in the rainy season. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 7, p. 1068-1073, 2009. Available at: <https://scialert.net/fulltext/?doi=pjn.2009.1068.1073> Accessed on: June 29, 2022.

KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.;

SCARAMUZZI, R. J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p.1225-1235, 2005. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15904956/> Accessed on: June 29, 2022.

KUKOVICS, S.; GYÖKÉR, S.; NÉMETH, T.; GERGÁTZ, E. Artificial insemination of sheep – possibilities, realities and techniques at the farm level. MANAFI, M. **Artificial insemination in farm animals**. Rijeka: InTech, 2011. p. 27-50. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/16098> Accessed on: June 29, 2022.

LEETHONGDEE, S. Development of trans-cervical artificial insemination in sheep with special reference to anatomy of cervix. **Suranaree Journal of Science and Technology**, v. 17, n.1, 57-69, 2010. Available at: https://www.researchgate.net/publication/266469980_Development_of_trans-cervical_artificial_Insemination_in_sheep_with_special_reference_to_anatomy_of_cervix. Accessed on: June 29, 2022.

LIMA, F. R. G. **Pesquisa de novo método de congelamento para sémen de ovinos Santa Inês**. 2010. p. 121. Tese (Doutoramento). Universidade Federal do Ceará/Universidade Federal da Paraíba/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fortaleza, Brasil.

MACÍAS, A.; FERRER, L. M.; RAMOS, J. J.; LIDÓN, I.; REBOLLAR, R.; LACASTA, D.; TEJEDOR, M. T. Technical Note: A new device for cervical insemination of sheep – design and field test. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 12, p. 5263-5269, 2017. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29293790/>. Accessed on: June 29, 2022.

MACÍAS, A.; MARTÍNA, E.; LAVIÑA, A.; FERRER, L. M.; LIDÓN, I.; REBOLLAR, R.; TEJEDOR, M. T. Cervical artificial insemination in sheep: sperm

volume and concentration using an antiretrograde flow device. **Animal Reproduction Science**, v. 221, n. 106551, 2020. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32861113/> Accessed on: June 29, 2022.

MASOUDI, R.; ZARE SHAHNEH, A.; TOWHIDI, A.; KOHRAM, H.; AKBARISHARIF, A.; SHARAFI, M. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. **Cryobiology**, v. 74, s/n., p. 77-80, 2017. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908687/> Accessed on: June 29, 2022.

MATEUS, O. J. P. **Controlo reprodutivo em ovelhas Awassi x Sarda**. 2014. p. 44. Dissertação (Mestrado). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal.

MCKUSICK, B. C.; THOMAS, D. L.; GOTTFREDSON, R. G.; ZELINSKY, R. D.; BERGER, Y. M. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. In: ANNUAL SPOONER SHEEP DAY, 46., 1998. **Proceedings...** Wisconsin: Universidade do Wisconsin-Madison, 1998.

MOLINA, A.; GALLEGRO, L.; TORRES A.; VERGARA, H. Effect of mating season and level of body reserves on fertility and prolificacy of Manchega ewes. **Small Ruminant Research**, v. 14, n. 3, p. 209-217, 1994. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0921448894900434> Accessed on: June 29, 2022.

MORRELL, J. M. Artificial insemination: current and future trends. In: MANAFI, M. **Artificial insemination in farm animals**. Rijeka: InTech, 2011. p. 1-14.

O'BREIN, A. Flushing the ewe flock: is it beneficial? Ontário: Ministério da Agricultura e Alimentação, Animal Science FactSheets, 2002.

2 p. Available at: <http://omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/02-055.htm> Accessed on: June 29, 2022.

OMONTESE, B. O.; REKWOT, P. I.; ATE, I. U.; AYO, J. O.; KAWU, M. U.; RWUAAN, J. S.; NWANNENNA, A. I.; MUSTAPHA, R. A.; BELLO, A. A. An update on oestrus synchronisation of goats in Nigeria. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 96-101, 2016. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2305050016000117>. Accessed on: June 29, 2022.

PALACÍN, I.; YÁNIZ, J. L.; FANTOVA, E.; BLASCO, M. E.; QUINTÍN-CASORRÁN, F. J.; SEVILLA-MUR, E.; SANTOLARIA, P. Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 3-4, p. 139-144, 2012. Available at: <http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v6i3a896/1071>. Accessed on: June 29, 2022.

PALACIOS, C. R. Manejo del semen e inseminación artificial. In: ABECIA, A.M.; FORCADA, F. **Manejo reproductivo en ganado ovino**. Saragoça: Editora Servet, 2010. p. 111-144.

PERA, D.M. **Sincronização ovárica e inseminação artificial em ovelhas cruzadas de Awassi x Sarda**. 2020, p. 68. Dissertação (Mestrado). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

RITAR, A. J.; MAXWELL, W. M. C.; SALAMON, S. Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestogen sponge-PMSG treatment. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 72, n. 2, p. 559-563, 1984. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6210363/> . Accessed on: June 29, 2022.

RUSSEL, A. J. F.; DONEY, J. M.; GUNN, R. G. Subjective assessment of fat in live sheep.

Journal of Agricultural Science, v. 72, n. 3, p. 451-454, 1969. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19701401769> Accessed on: June 29, 2022.

SALOMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924821/> Accessed on: June 29, 2022.

SANTOLARIA, P.; PALACIN, I.; YANIZ, J. Management factors affecting fertility in sheep. In: MANAFI, M. **Artificial insemination in farm animals**. Rijeka: InTech, 2011. p 167-190.

SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 267-275, 1997. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728126/> Accessed on: June 29, 2022.

SCARAMUZZI, R. J.; MARTIN, G. B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, suppl. 2, p. 129-36, 2008. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18638114/> Accessed on: June 29, 2022.

SHACKELL, G.H.; KYLE, B.; LITTLEJOHN, R.P. Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 50, s/n., p. 427-430, 1990. Available at: <http://www.nzsap.org/proceedings/1990/factors-influencing-success-large-scale-artificial-insemination-programme-sheep> Accessed on: June 29, 2022.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1980. 185 p.

STELLFLUG, J. N.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; HENSLEY, E. L.; COWARDIN, E. A.; SEALS, R. C.; LEWIS, G. S. Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: Effects on laparoscopic artificial insemination. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 4, p. 568-570, 2001. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11263815/>. Accessed on: June 29, 2022.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2.ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Company, 1980. 633 p.

STEYN, J. J. Application of artificial insemination (AI) on commercial sheep and goat production. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003. SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA. **Anais...** João Pessoa, 2003. p. 367-379.

SWELUM, A. A-A.; SAADELDIN, I. M.; MOUMEN, A. F.; ALI, M. A.; ALOWAIMER, A. N. Efficacy of controlled internal drug release (CIDR) treatment durations on the reproductive performance, hormone profiles, and economic profit of Awassi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 166, s/n., p. 47-52, 2018a. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448818301433>. Accessed on: June 29, 2022.

SWELUM, A. A-A.; SAADELDIN, I.M.; MOUMEN, A.F.; ALI, M.A.; BA-AWADH, H.; ALOWAIMER, A.N. Efficacy of using previously used controlled internal drug release (CIDR) insert on the reproductive performance, hormone profiles and economic measures of sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 5, p. 1114-1122, 2018b. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29892981/>. Accessed on: June 29, 2022.

nlm.nih.gov/29892981/. Accessed on: June 29, 2022.

VALENTIM, R.; FERNANDES, M.; AZEVEDO, J.; MENDONÇA, A.; ALMEIDA, J.; VELASCO, H.; SIMÕES, J.; FONTES, P.; MAURÍCIO, R.; CARDOSO, M.; CORREIA, T. Anticipación de la estación reproductiva en ovejas de la raza Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial. In: CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA, 34., 2009, Barbastro. **Anais [...]**, 2009. p. 403-407.

VALENTIM, R.; RODRIGUES, I.; MONTENEGRO, T.; SACOTO, S.; AZEVEDO, J., 2015. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 4. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos naturais. **Agrotec**, v. 17, n. 10, p. 19-23, 2015a. Available at: https://www.researchgate.net/publication/282327460_Manejo_reprodutivo_em_ovinos_e_caprinos_4_Controlo_da_atividade_reprodutiva_em_pequenos_ruminantes_-_metodos_naturais. Accessed on: June 29, 2022.

WINDSOR, D. P. Factors influencing the success of transcervical insemination in merino ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 6, p. 1009-1018, 1995. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X9500065G>. Accessed on: June 29, 2022.