



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**MAIOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA ASSOCIADO AO USO DE  
AGONISTA DE GnRH NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES  
OVINOS**

**OSCAR OLIVEIRA BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**FEVEREIRO DE 2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**MAIOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA ASSOCIADO AO USO DE  
AGONISTA DE GnRH NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES  
OVINOS**

**Aluno: Oscar Oliveira Brasil**

**Orientador: Alexandre Floriani Ramos**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 80/2013**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO DE 2013**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BRASIL, O. O. **Maior tempo de exposição à progesterona associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 69p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte

## FICHA CATALOGRÁFICA

BRASIL, Oscar Oliveira. **Maior tempo de exposição à progesterona associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 69p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Produção embrionária. 2. Santa Inês. 3. Superestimulação. 4. FSH.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**MAIOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA ASSOCIADO AO  
USO DE AGONISTA DE GnRH NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES OVINOS**

**OSCAR OLIVEIRA BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, DOUTORADO (EMBRAPA RECURSOS  
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (ORIENTADOR)**

---

**IVO PIVATO, DOUTORADO (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)**

---

**BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA, DOUTORADO (EMBRAPA RECURSOS  
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 18 de Fevereiro de 2013.**

*Aos meus pais, Francisca e Olvídio, que mesmo sem entenderem minhas escolhas sempre acreditaram no meu sucesso, talvez até mais do que eu mesmo. Aos meus irmãos Rafael, Rodrigo e Gabriel pelo apoio e amizade. A minha namorada Nathalia Hack, pelo amor verdadeiro que me é oferecido, saiba que você, princesa, é a minha maior conquista. Com muito amor dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida, família, amigos e por estar sempre ao meu lado. Só com suas bênçãos, todo este esforço foi possível!

Aos meus pais, Francisca e Olvídio, pelo amor incondicional, pela credibilidade e pelo apoio imensurável para que eu me mantivesse firme frente às adversidades da vida. Acredito que esse momento significa algo a mais para vocês do que para qualquer outra pessoa.

Aos meus irmãos Rafael, Rodrigo e Gabriel pelo incentivo, amizade, confiança e pela importância que representam em minha vida.

À mestrandia Nathalia Hack Moreira, minha namorada, por toda ajuda durante a execução deste experimento, por dividir comigo seus conhecimentos e experiências na Medicina Veterinária, pelas palavras diárias de apoio, incentivo e conforto, essenciais para que eu me mantivesse firme e determinado a prosseguir. Garanto que este trabalho teria sido muito mais difícil sem sua ajuda. A você minha querida, meu amor e gratidão. Jamais irei esquecê-la.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Floriani Ramos, pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência e ensinamentos. Declaro aqui minha admiração pelo seu exemplo de Médico Veterinário e Pesquisador.

À Pesquisadora Dra. Bianca Damiani por compartilhar comigo sua experiência em superovulação, pela ajuda imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho e por ter aceitado, tão prontamente, o convite para participação da banca examinadora.

Ao Professor Dr. Ivo Pivato pelos ensinamentos e atenção disponibilizada, além da disposição em participar da banca examinadora. Profissional cuja presteza e simplicidade deveriam servir como exemplo de caráter para qualquer grande pesquisador.

Aos amigos José Maurício, Cleidson Manoel, Rodrigo Vasconcelos e Erika Bezerra, os melhores médicos veterinários que já conheci cujos exemplos sempre busco seguir e por acreditarem em meu potencial, sempre me incentivando a lutar pelos meus sonhos. Pela união em todos os momentos e pela certeza de que sempre poderei contar com vocês. Sou eternamente grato por todos os ensinamentos.

Aos amigos Divens Firmino, Edgar Tavares e Mateus Diógenes, por toda ajuda durante a graduação e, sobretudo pela grande amizade.

Aos meus familiares, que sempre incentivaram, apoiaram e acreditaram nos meus estudos. Procurei transformar a saudade em incentivo para superar todos os desafios. Não teria como listar cada um de vocês, sintam-se todos lembrados e considerados, pois é o sentimento que tenho por cada um de vocês.

Ao mestrando Gilberto Santos Júnior, pela ajuda durante a execução da parte prática do trabalho, por descontrair o ambiente com estórias engraçadas e, sobretudo pela amizade.

Ao amigo e técnico do laboratório Normandes, pelo apoio, ajuda e paciência.

Aos alunos de iniciação científica Mairon e Priscila, pela ajuda durante realização da parte prática do trabalho. Pela coexistência, proporcionando momentos de alegrias e descontração durante o mestrado.

Aos amigos Eleonora, Heitor, José Felipe, Paula, Rodrigo, João, Carolle, Vladinis, Mateus, Anelise, pelas discussões acadêmicas, pela amizade, apoio, companheirismo, preocupação, conselhos, comemorações e por me ajudarem a crescer profissionalmente.

Aos funcionários da EMBRAPA do Setor Campo Experimental Fazenda Sucupira, “Dona Zefinha”, “Dona Lia”, “Dona Mara”, Manoel, Weber, “Japão” e todos os outros que fizeram parte da minha vida durante este trabalho e pela amizade.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte ao trabalho realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo.

À Universidade de Brasília (UnB), em especial ao programa de Pós Graduação em Ciências Animais.

## ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xv
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivo Geral.....	4
1.2 Objetivos Específicos.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 A transferência de embriões.....	5
2.2 Progestágenos e produção embrionária.....	6
2.3 Gonadotrofinas para superovulação.....	7
2.4 Diferenças genéticas.....	12
2.5 Repetidas superovulações e coleta de embriões.....	13
2.6 Anormalidades na ovulação e recuperação embrionária.....	14
2.7 Variabilidade na resposta superovulatória e uso de indutor de ovulação.....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
 CAPÍTULO 2 – MAIOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA ASSOCIADO AO USO DE AGONISTA DE GNRH NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS.....	 27
1 RESUMO.....	28
2 ABSTRACT.....	30
3 INTRODUÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Local do Experimento.....	34
4.2 Animais e tratamentos.....	35
4.3 Avaliação da resposta superestimulatória e superovulatória.....	36
4.4 Avaliação do estro.....	37
4.5 Inseminação artificial.....	37
4.6 Coleta de embriões.....	38
4.7 Avaliação embrionária e resposta superovulatória.....	39
4.8 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 3.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53



## RESUMO

### **MAIOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA ASSOCIADO AO USO DE AGONISTA DE GnRH NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS**

Oscar Oliveira Brasil<sup>1</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, Brasília-DF, <sup>2</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) vêm evoluindo ao longo dos últimos anos, contudo ainda existe uma grande variabilidade na resposta superovulatória e produção embrionária que limita o sucesso desta tecnologia na ovinocultura. Um aumento da qualidade folicular e oocitária associado a uma maior controle do momento das múltiplas ovulações poderia ser benéfico para aumentar o número de embriões produzidos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da maior exposição à progesterona exógena, durante a superestimulação, associado ou não a adição de agonista de GnRH sobre a resposta superovulatória, produção e qualidade embrionária, usando sêmen congelado. Quarenta e oito fêmeas da raça Santa Inês, foram sincronizadas com a inserção de um implante intravaginal (CIDR). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: exposição à progesterona por 14 dias (Controle; n = 14); prolongamento de 12 horas na exposição à progesterona (G12hP4; n = 21); e prolongamento de 12 horas associado a uma aplicação de 25 µg de lecirelina (G12hP4GnRH; n = 13). Para superestimulação, 133 mg de pFSH foram administradas em doses decrescentes em 8 aplicações. A resposta superestimulatória e a quantidade de folículos grandes ainda não ovulados foram avaliadas

por ultrassonografia (US), ao final do tratamento com FSH e 12 horas após a segunda inseminação artificial (IA), respectivamente. O estro foi detectado com auxílio de rufiões após a remoção do CIDR, e as inseminações foram realizadas 36 e 48 horas após a retirada do mesmo, usando sêmen congelado ( $100 \times 10^6$  epz/dose). Cinco dias após a primeira inseminação, o número de corpos lúteos (CL) foi avaliado por laparoscopia e os embriões colhidos por laparotomia pré-púbica. A quantidade de ovelhas em estro e o tempo de início do estro após a remoção do dispositivo de progesterona foi semelhante entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Todos os grupos tiveram uma elevada resposta superestimulatória (médias variando de 14,33 a 16,18 folículos  $\geq 4$  mm) ( $P > 0,05$ ). O número de CL foi elevado em todos os grupos (variação de 11 a 12) ( $P > 0,05$ ). O percentual de fertilização foi maior ( $P < 0,05$ ) no G12hP4GnRH do que no Controle e G12hP4 (77%, 34%, e 41%, respectivamente). O maior tempo de exposição à progesterona reduziu ( $P < 0,05$ ) a proporção de embriões degenerados (Controle = 30%; G12hP4 = 7% e GP12hP4GnRH = 10%). A associação do aumento da exposição à progesterona com administração de GnRH reduziu a degeneração embrionária e aumentou a fertilização dos oócitos, podendo ser adotada nos programas de MOTE.

Palavras chaves: produção embrionária, Santa Inês, superestimulação, FSH.

**ABSTRACT****LONGER EXPOSURE TO PROGESTERONE ASSOCIATED WITH GnRH  
AGONIST FOR SUPEROVULATION AND EMBRYO PRODUCTION IN SHEEP**

Oscar Oliveira Brasil<sup>1</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, <sup>2</sup> Embrapa Genetic Resources and  
Biotechnology

Multiple ovulation and embryo transfer programs (MOET) have been evolving over the past few years, however there is still wide variability in superovulatory response and embryo production which limits this technology success of for the sheep industry. An increase in follicular and oocyte quality associated with a control of multiple ovulations moment could be beneficial to increase the produced embryos number. This study aimed to evaluate the effect of increased the exposure time to exogenous progesterone during overstimulation, with or without the addition of GnRH agonist at superovulatory response. For the experiments of embryo production and to access the quality frozen semen was used. Forty-eight Santa Ines ewes were synchronized with intravaginal insertion of progesterone implant (CIDR). The animals were randomly divided into three groups: exposure to progesterone for 14 days (Control, n = 14); extension of 12 hours progesterone exposure (G12hP4, n = 21); and 12 hours extension associated with an application of 25 µg of Lecirelin (G12hP4GnRH, n = 13). For overstimulation, 133 mg of pFSH in decreasing doses were administered in eight applications. Superstimulatory response and large follicles amount that has not ovulated were evaluated by ultrasonography (US), after the treatment with FSH and 12 hours after the second artificial insemination (AI), respectively. Estrus was detected with the aid of thugs

after CIDR removal and inseminations were performed 36 and 48 hours after removal, using frozen semen ( $100 \times 10^6$  spz/dose). Five days after the first insemination, the number of corpora lutea (CL) was measured by laparoscopy and the embryos were collected by prepubic laparotomy. The amount of oestrus ewes and time of onset of estrus after device removal of progesterone was similar between groups ( $P > 0.05$ ). All groups had a high superstimulatory response (averages ranging from 14.33 to 16.18 follicles  $\geq 4$  mm) ( $P > 0.05$ ). The number of CL was high in all groups (averages ranging from 11 to 12.00) ( $P > 0.05$ ). The fertilization rate was significantly higher in the G12hP4GnRH compared to the Control and G12hP4 (77%, 34% and 41%), respectively. The longer exposure to progesterone reduced degenerated embryos proportion (Control = 30%; G12hP4 = 7% and G12hP4GnRH = 10%). The association of increased progesterone exposure time and GnRH administration reduces embryonic degeneration and increased oocytes fertilization rates and it may be adopted at MOET programs.

Keywords: embryos, conservation, superstimulation, FSH.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
	<b>Capítulo 2</b>	
Figura 2.1	Protocolos hormonais destinados à superovulação das ovelhas Santa Inês doadoras de embriões.	36

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 2</b>		
Tabela 2.1	Efeito da maior exposição à progesterona com ou sem agonista do GnRH sobre o comportamento de estro e resposta ovulatória das doadoras Santa Inês	41
Tabela 2.2	Efeito da maior exposição à progesterona com ou sem agonista do GnRH sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês	42
Tabela 2.3	Efeito da maior exposição à progesterona com ou sem agonista do GnRH sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês	42

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações**

- > – Maior
- $\geq$  – Maior ou igual
- < – Menor
- ~ – Aproximadamente
- % – Porcentagem
- °C – Graus Celsius
- $\mu\text{g}$  – Micrograma
- ANOVA – Análise de Variância
- Anti-eCG – Anticorpo monoclonal anti-eCG
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal
- CIDR – Dispositivo Interno de Liberação de Progesterona
- CL – Corpo Lúteo
- DF – Distrito Federal
- eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
- FGA – Acetato de Fluorogestona
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- g – Gramas
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
- h – Horas
- ha – hectare
- hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana
- IA – Inseminação Artificial
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
- LH – Hormônio Luteinizante
- Kg – Quilograma
- MAP – Acetato de Medroxiprogesterona
- mg – Miligramas
- MHz – Mega Hertz
- mL – Mililitros
- mm – Milímetro
- MOTE – Programa de múltipla ovulação e transferência de embriões
- n° – Número
- n – Número de amostras
- ng – Nanograma
- oFSH – Hormônio Folículo Estimulante de origem ovina
- P – Probabilidade de erro
- P4 – Progesterona
- PBS – Tampão Fosfato Salina
- pFSH – Hormônio Folículo Estimulante de origem suína
- PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina-F2 $\alpha$
- PVP – Polivinilpirrolidona
- RPCL – Regressão Prematura de Corpo Lúteo
- S – sul
- SAS – Programa estatístico
- TRA – Tecnologias de reprodução assistida
- UI – Unidades Internacionais

US – Ultrasonografia  
W – Oeste



## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Os ovinos tem uma significativa contribuição para a produção global de alimentos. Esses animais apresentam um papel enfático, principalmente para as economias dos países em desenvolvimento e, em particular, para aqueles com condições climáticas desfavoráveis, ou com terras na sua maioria subférteis. No Brasil o rebanho ovino é formado por aproximadamente 17,6 milhões de cabeças (IBGE, 2011), sendo a raça Santa Inês a mais criada nas diferentes regiões por apresentar características como alta rusticidade, fertilidade e precocidade (Silva et al., 2010). Contudo, muitos animais ainda exibem baixos índices zootécnicos e outras raças localmente adaptadas apresentam-se ameaçadas de extinção. Dessa forma a adoção de tecnologias de reprodução assistida (TRA), como a produção in vivo de embriões, é uma tecnologia importante para o melhoramento genético e para o resgate e conservação *ex situ*, em bancos de germoplasma, de raças localmente adaptadas e ameaçadas de extinção.

Os Bancos de Germoplasma constituem um recurso fácil e de grande importância na preservação do germoplasma das raças naturalizadas. Pela criopreservação de sêmen e de embriões poder-se-á, no futuro, resgatar populações que por algum motivo possam ter se extinguido e que tenham importantes características para a pecuária nacional. Dessa forma há a possibilidade de buscar a variabilidade necessária e características de adaptabilidade às intempéries da natureza, com vista a aumentar a produção ou acrescentar genes de interesse econômico às raças comerciais (Hiemstra et al., 2006). A criopreservação de embriões permite a conservação do germoplasma de fêmeas, além de permitir o intercâmbio deste material para outras regiões ou países, com o mínimo risco de transmissão de doenças (Baril et al., 1995).

Apesar dos avanços nos últimos anos, ainda há uma variabilidade na produção *in vivo* de embriões ovinos, que possivelmente está relacionada à elevada variação na resposta superovulatória, que limita a difusão desta tecnologia (Sharma et al., 1993; Cognie et al., 1999; Cognie & Baril, 2002). O tratamento superestimulatório e a diferença na composição dos preparados de hormônio folículo estimulante (FSH) disponível comercialmente são apontados como algumas das causas (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; D'Alessandro et al., 2005). O sucesso da resposta ovariana ao tratamento superovulatório também é dependente de fatores como a condição folicular, a genética, a estação do ano e o estado nutricional dos animais (Gonzalez-Bulnes et al., 2003; Kakar et al., 2005; Ammoun et al., 2006). Esses fatores podem agir direta ou indiretamente influenciando a qualidade oocitária/embrionária e/ou a sincronia das múltiplas ovulações.

Para o desenvolvimento de um embrião saudável é necessário que o oócito adquira competência, e isto ocorre entre o final da fase de crescimento e início da fase de maturação oocitária, por meio de mudanças estruturais e moleculares (Hyttel et al., 1997; Dieleman et al., 2002). Entretanto, durante o fim do tratamento superestimulatório é possível que existam oócitos que não adquiriram a competência completa. Portanto, acredita-se que uma exposição prolongada à progesterona durante a superestimulação com FSH iniba por um maior tempo o pico de LH. Isso possivelmente permitiria que os folículos que contenham oócitos ainda não competentes venham a desenvolver competência, e assim, produzam embriões viáveis.

Além disso, o uso do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou seus agonistas, após a estimulação com FSH, proporciona uma boa sincronia das ovulações e maior produção de embriões (Walker et al., 1986; Menchaca et al., 2009), apesar de alguns relatos controversos (Baril et al., 1996; Jabbour et al., 1996).

A adoção de estratégias como um maior tempo de exposição à progesterona exógena associado à indução da ovulação parece ser uma alternativa viável para melhorar a taxa de fertilização oocitária e qualidade embrionária principalmente quando é empregado sêmen congelado nas inseminações em tempo fixo.

## **1.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da maior exposição à progesterona exógena, durante a superovulação, associado ou não a adição de agonista de GnRH como indutor de ovulação sobre a resposta superovulatória, produção e qualidade embrionária, usando sêmen congelado.

## **1.2 Objetivos Específicos**

Melhorar a produção de embriões de ovelhas superovuladas usando sêmen congelado, através do uso de protocolos com maior tempo de exposição à progesterona exógena e com ou sem adição de indutor da ovulação.

Avaliar a resposta superestimulatória e superovulatória de ovelhas submetidas a protocolos com maior tempo de exposição à progesterona exógena e com ou sem a adição de GnRH.

Avaliar a taxa de fertilização de ovelhas superovuladas e inseminadas com sêmen congelado

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A transferência de embriões

A transferência de embriões baseia-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da inseminação artificial (IA) e da colheita dos embriões através da lavagem uterina, e posterior transferência a fêmeas receptoras, tendo como finalidade de complementarem o período de gestação (Reichenbach et al., 2002). As possibilidades que oferece a transferência de embriões, como método de multiplicação rápida do número de descendentes de uma determinada fêmea, têm grande interesse tanto do ponto de vista básico, na investigação sobre o desenvolvimento embrionário, como do aspecto prático de produção animal (López-Sebastián, 2006). O incremento do número de descendentes por fêmea faz dessa técnica um instrumento de progresso genético, por aumentar a pressão de seleção, e ainda, reduzir o intervalo entre gerações (Amiridis & Cseh, 2012). Entre outras aplicações, fornece base técnica para implantação de outras biotecnologias afins, facilita trâmites comerciais de importação e exportação de material genético por garantia sanitária (Baril et al., 1995), além de permitir a preservação *ex situ* de animais em risco de extinção (Solti et al., 2000).

O sucesso da transferência de embriões depende do manejo sanitário e nutricional das fêmeas, sincronismo do estro entre doadoras e receptoras, resposta superovulatória das doadoras, inseminação artificial, coleta, avaliação e transferência dos embriões e outros fatores que afetam a sobrevivência dos embriões transferidos.

## 2.2 Progestágenos e produção embrionária

Em ovinos, um programa de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) tradicionalmente inclui a inserção de uma esponja vaginal contendo análogos da progesterona como o acetato de fluorogestona (FGA) ou acetato de medroxiprogesterona (MAP), ou mesmo a progesterona em si, por uso do dispositivo interno de liberação de progesterona (CIDR), que permanecem por 12 ou 14 dias, a fim de induzir e sincronizar o ciclo estral (Thibier & Guérin, 2000). A administração exógena de gonadotrofinas, para estimular o crescimento folicular, inicia dois dias antes da remoção do progestágeno. Quando o tratamento não é capaz de manter concentrações fisiologicamente normais de progesterona, é possível que haja alterações nos padrões de crescimento folicular e dominância dos grandes folículos estrogênicos (Scaramuzzi et al., 1988; Leyva et al., 1998; Viñoles et al., 1999), bem como alterações no processo de fertilização e no desenvolvimento do embrião (Theodosiadou, et al., 2004; Gonzalez-Bulnes et al., 2005).

Foi comprovado que após seis dias de tratamento com progestágenos intravaginas a concentração sérica de progesterona declina a níveis subluteais, e permanece baixa, até que o dispositivo seja retirado (Greyling et al., 1994). A fim de superar os efeitos negativos da baixa progesterona/progestágeno, sugere-se que a inserção de um novo progestágeno no dia 7 (Gonzalez-Bulnes et al., 2002a) ou no dia 9 (Thompson et al., 1990) em um tratamento de 14 dias, resulta em melhores respostas ovulatórias e rendimento embrionário. Esse efeito ocorre possivelmente devido à manutenção de altas concentrações de progesterona durante todo o tratamento. Em bovinos, concentrações plasmáticas de P4 maiores que 3 ng/mL, durante o início do tratamento superestimulatório com FSH, também está associado a um aumento no número de ovulações, e melhor qualidade dos embriões produzidos (Goto et al. 1988).

Por outro lado em bovinos (*Bos indicus*), altas concentrações de progesterona em vacas tratadas com implante de progesterona e que apresentam um corpo lúteo (CL) funcional está relacionado com menores taxas de crescimento folicular e ovulação, devido a menor frequência de pulsos de hormônio luteinizante (LH), o que justifica o uso de prostaglandina nos protocolos (Carvalho et al., 2008). Outro fato que pode reforçar o uso de

prostaglandinas é que em ovinos acredita-se que exista um efeito inibitório local da presença do CL sobre o crescimento de folículos antrais para tamanhos até 3 mm de diâmetro (Bartlewski et., 2011), fato não desejado durante a superestimulação com FSH.

Uma alternativa que pode ser adotada, em substituição ao uso de progestágenos intravaginais e que permite uma elevada resposta superovulatória e alta qualidade embrionária, seria o aproveitamento da fase luteal precoce, iniciando a superestimulação com FSH quatro dias após o estro, aproveitando as concentrações fisiológicas de progesterona (Mayorga et al., 2011). Essa tecnologia tem como desvantagem a necessidade de um prévio tratamento de sincronização, para induzir a ovulação das doadoras, ou um monitoramento diário dos animais, a fim de identificar o estro natural, sendo este, prático apenas em programas de pequena escala.

### **2.3 Gonadotrofinas para superovulação**

As gonadotrofinas mais utilizados para a superovulação das doadoras são a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o hormônio folículo estimulante (FSH) de origem suína (FSHp) ou ovina (FSHo) (Cognie, 1999; Amiridis & Cseh, 2012). Desses o eCG foi a primeira droga amplamente utilizada para superovulação, na dose de 1000 a 2000 UI, um ou dois dias antes da remoção do progestágeno, em uma única injeção intramuscular (Cognie, 1999).

O eCG apresenta uma longa meia-vida in vivo, por isso pode resultar em uma alta incidência de folículos anovulatórios, que são responsáveis por alta produção de estradiol (Moor et al., 1985). É provável que a condição estrogênica, provocada por esses folículos altere o transporte de gametas através do trato genital e, portanto, diminua as taxas de recuperação embrionária (Whyman & Moore, 1980; Evans & Armstrong, 1984). Tais efeitos adversos são reduzidos neutralizando o eCG com anticorpo monoclonal, após estimulação folicular (Martemucci et al., 1995). Uma alternativa para evitar o uso do anti-eCG, seria a administração de GnRH no início da manifestação do estro (Jabbour & Evans, 1991).

Alterações em eventos endócrinos e maturação prematura do oócito (Moor et al., 1985) podem explicar a baixa eficiência do eCG.

A menor eficiência do eCG para a produção de embriões *in vivo*, nas últimas três décadas, contribuiu para uma substituição deste hormônio por preparados comerciais de FSH de origem suína (pFSH) (Armstrong & Evans, 1983; Jabbour & Evans, 1991; Menchaca et al., 2009), e em menor escala de origem ovina (oFSH) (Gonzalez-Bulnes et al., 2002a; Veiga-Lopez et al., 2008).

Estudos atuais comparando múltiplas aplicações de pFSH e uma única aplicação de eCG, para superovular ovelhas da raça Awassi, durante as estações reprodutiva e não reprodutiva, apresentaram resultados superiores para o pFSH em ambas as estações (Azawi & Al-Mola., 2010; Cueto et al., 2011). Na estação reprodutiva apenas a resposta superovulatória foi significativamente maior, enquanto que na estação não reprodutiva tanto a resposta superovulatória como a produção de embriões foram melhores na superestimulação com FSH (Azawi & Al-Mola, 2010). Sugerindo que a diferença entre os protocolos com pFSH e eCG seja mais evidente na estação não reprodutiva.

Devido à sua curta meia-vida, as preparações de FSH têm que ser administradas repetidamente, conferindo ao tratamento um maior manejo (Kanitz et al., 2002). Seis a oito aplicações, em intervalos de 12 horas, a partir de dois ou três dias antes da remoção do progestágeno são necessárias. O regime de administração (número de aplicações e protocolo de dosagem: constante ou doses decrescentes) são comumente questionados.

Torrès et al. (1987) foram os primeiros a usar um regime de doses decrescentes de pFSH na superovulação de ovelhas, obtendo maiores taxas de ovelhas superovuladas. O tratamento com doses decrescentes pode reduzir a incidência de folículos anovulatórios ao final da estimulação gonadotrófica, devido à menor quantidade de FSH administrada ao final da superestimulação, levando a uma menor atresia de folículos grandes (Avdi et al., 1997; Gonzalez-Bulnes et al., 2000, 2004).

Os preparados de FSH disponíveis comercialmente a partir de extratos de pituitária, inevitavelmente não possuem uma composição uniforme. O teor em LH é variável de lote para lote, podendo afetar seriamente o resultado superovulatório em termos de resposta ovariana, taxa de fertilização e qualidade embrionária (Wu et al., 2011).



A proporção adequada de FSH:LH nos preparados comerciais de FSH é crucial para a resposta superovulatória da doadora, no qual o baixo teor de LH pode ser melhor para o desenvolvimento folicular e a obtenção de mais embriões transferíveis (Nowshari et al., 1995; Boscós et al., 2002). Contudo, tomando por base o conceito de que a relação FSH:LH em condições fisiológicas diminui da regressão luteal para o pico pré-ovulatório (Cahill et al., 1981), protocolos que seguem este conceito tem sido usados com sucesso em ovinos (Cognie et al., 1986; D'Alessandro et al., 1997).

No entanto, ovelhas superestimuladas com oito doses decrescentes de pFSH e redução da relação FSH/LH (1,6:1; 1:1; 0,6:1; 0,3:1), apresentaram menor número de embriões transferíveis comparado a uma relação constante de FSH/LH (1,6:1), embora a resposta superovulatória tenha sido significativamente melhor, o número de estruturas degeneradas foi significativamente maior no primeiro tratamento (D'Alessandro et al., 2005). Pode ser que esse protocolo seja eficiente apenas durante a estação não reprodutiva, uma vez que este se mostrou eficiente neste período (Cognie et al., 1986; D'Alessandro et al., 1997).

Os protocolos convencionais requerem manejo intensivo devido às múltiplas aplicações de FSH, portanto, estão sujeitos a erros na dosagem e no horário de aplicação do hormônio, assim como, são fatores estressantes que podem prejudicar o desempenho reprodutivo dos animais (Simonetti et al., 2008). Assim, a simplificação dos protocolos seria benéfica para evitar esses problemas.

Na tentativa de simplificar o protocolo e reduzir a quantidade de FSH, Wu et al. (2011) obtiveram um elevado número de embriões viáveis, quando superestimularam ovelhas da raça Xinji durante a estação reprodutiva, com 130 mg de pFSH distribuído em apenas três aplicações, a cada 24 horas, somado a 500 UI de eCG no dia de remoção do dispositivo de progesterona, sendo tão eficiente quanto 150 mg de pFSH distribuídos em seis aplicações, a cada 12 horas.

O uso de uma única dose intramuscular de FSH, dissolvido em polivinilpirrolidona (PVP), um veículo oleoso que torna mais lenta a taxa de absorção do FSH, foi utilizado em ovelhas 24 horas antes da retirada do MAP. Foi tão eficaz em induzir uma resposta ovulatória como os protocolos convencionais com múltiplas doses de FSH (Dattena et al., 1994; D'Alessandro et al., 2001). Em contraste, outros estudos não conseguiram obter resultados satisfatórios usando o mesmo tratamento simplificado,

ressaltando a importância de diferenças genéticas na resposta a tratamentos superovulatórios específicos (Simonetti, et al., 2008; Wu et al., 2011).

A associação de uma única aplicação de eCG (500 UI) com uma pequena dose de oFSH, porém sem utilizar o PVP, administrados 48 horas antes da remoção do progestágeno em ovelhas Corriedale, resultou em taxa de ovulação e produção de embriões viáveis, semelhantes aos resultados obtidos utilizando o protocolo padrão de oito doses de oFSH (Simonetti, et al., 2008).

Com a utilização de protocolos simplificados é possível uma redução de manejo, menores gastos com hormônios, além de permitir uma condição menos estressante para os animais. Contudo a eficiência desses tratamentos ainda necessita de estudos mais aprofundados.

Independente do tipo de gonadotrofina utilizada e do esquema de aplicação adotado é bem aceito que, a condição folicular ovariana, no início do tratamento superestimulatório é de suma importância para a resposta superestimulatória final (Gonzales-Bulnes et al., 2002a, 2004; Veiga-Lopez et al., 2008). Em particular, no dia de início do tratamento com a gonadotrofina, a presença de folículo dominante (s) atenua a resposta superovulatória (Rubianes et al., 1995), enquanto que a taxa de ovulação é aumentada quando estão presentes apenas folículos antrais de tamanho pequeno e/ou médio (Gonzalez-Bulnes et al., 2002b).

Fêmeas com um folículo dominante apresentam alterações no desenvolvimento folicular, que incluem maior atresia, atraso no recrutamento e crescimento folicular, além de apresentarem folículos com menor tamanho de oócitos com redução da qualidade e capacidade de retomada da meiose durante a maturação (Veiga-Lopez et al., 2008). Esses mesmos autores também verificaram que o tamanho muito pequeno dos dois maiores folículos, na primeira aplicação de FSH, tem uma relação com menores taxas de metáfase II. Tudo isso sugere que há uma elevada taxa de infertilização, após a estimulação gonadotrófica, em folículos subordinados e/ou que apresentam relativa imaturidade.

Portanto, é desejável que o tratamento superovulatório inicie durante a emergência da onda folicular ou na ausência de uma dominância folicular estabelecida. Em pequenos ruminantes, isso pode ser conseguido com o uso de fármacos que inibam o desenvolvimento folicular no início da superovulação (Cognie, 1999; Cognie et al., 2003). A

dominância é adquirida em um ambiente com altas concentrações de LH (Campbell et al., 1995) e, portanto, intervenções farmacêuticas com administração de agonista ou antagonistas do GnRH podem ser realizadas com intuito de suprimir a secreção de LH (Cognie, 1999; Cognie et al. 2003).

Os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas são obtidos pela modificação da estrutura molecular deste decapeptídeo para exercer efeitos agonista ou antagonista sobre as células gonadotróficas da glândula pituitária anterior. A administração contínua de agonistas do GnRH, após um efeito estimulatório inicial (*flare-up*), leva a uma dessensibilização das células gonadotróficas pelo *dow-regulation* dos receptores de GnRH e desregulação da sinalização intracelular (Reissmann et al., 1993). Contudo, devido ao efeito inicial *flare-up*, a queda do LH e do FSH pode demorar 14-21 dias para ocorrer (Shapiro, 2003). Dessa forma para um controle do crescimento folicular é necessário um pré-tratamento com várias aplicações diárias do agonista, o que pode se tornar muito dispendioso (Cognie, 1999).

Ao contrário, os antagonistas de GnRH produzem um efeito imediato por bloquear de forma competitiva os receptores de GnRH, provocando um rápido declínio das concentrações séricas de FSH e LH (Diedrich et al., 1994). Suas propriedades não necessitam de um período de dessensibilização e, além disso, a pituitária mantém a sua capacidade de resposta à estimulação com GnRH ou seus agonistas (Reissmann et al., 1993). Uma única aplicação, subcutânea de 1,5 mg de antagonista do GnRH (Antarelix), diminui a secreção de gonadotrofinas, inibindo a secreção pulsátil de LH por pelo menos 48 horas, após a administração, inibindo o desenvolvimento de folículos grandes, enquanto aumenta significativamente o número de pequenos e médios folículos (Lopez-Alonso et al., 2005). Essa é uma metodologia promissora para ser adotada em protocolos de superovulação.

Contudo, em caprinos, um pré-tratamento com antagonista do GnRH, durante a superestimulação com eCG, apesar de conduzir a uma maior resposta superestimulatória, leva ao aumento do número de folículos não fertilizados (Heidari et al., 2010). Justificando a necessidade de mais pesquisas, com o uso desse fármaco, para controlar os efeitos indesejáveis.

Outra abordagem que pode ser empregada, visando o maior controle do crescimento da população folicular é o “método do dia 0”, que consiste em iniciar a superestimulação com FSH no dia da ovulação, a qual coincide com o surgimento da primeira

onda folicular. Nesse protocolo, as ovelhas recebem um curto tratamento de progesterona combinado com prostaglandina e eCG no momento da retirada da esponja. A ovulação é induzida, 36 horas mais tarde, com uma aplicação de um agonista do GnRH. O tratamento superovulatório inicia 72-84 horas após a remoção da esponja, utilizando 6 a 8 aplicações de FSH em doses decrescentes, seguido por administração de PGF2 $\alpha$  nas duas últimas doses, enquanto que as ovulações são sincronizadas com uma única dose de buserelina, administrada 12h após a última injeção de FSH (Menchaca et al., 2009).

Em um estudo de superovulação usando o método do dia 0 e um protocolo convencional (14 dias exposição à progestágeno e oito aplicações de FSH), em ovelhas da raça Santa Inês, a quantidade de CL e embriões viáveis não diferiram entre os dois tratamentos (Neves et al., 2010). A metodologia do dia 0 descrita por Menchaca et al. (2009) aumentou significativamente o número de CL e embriões viáveis comparado ao protocolo convencional. Um fato que pode ter levado a discrepância de resultados é que o tempo de aplicação do GnRH e o tempo considerado para ocorrência da ovulação, após o tratamento básico de sincronização do estro, foram diferentes nas duas metodologias do dia 0 citadas.

Uma desvantagem que pode existir ao iniciar a superestimulação com FSH durante a primeira onda, é que os folículos desta onda crescem em um meio hormonal muito diferente dos da segunda onda, devido à presença de um CL em crescimento com menor produção de progesterona (Viñoles et al., 1999). Portanto, o uso de um dispositivo de progesterona durante a superestimulação com FSH poderia ser benéfico na qualidade folicular e oocitária, assim como demonstrado em bovinos também utilizando o método do dia 0 (Nasser et al., 2011).

## **2.4 Diferenças genéticas**

A raça é um fator de variação amplamente reconhecido na resposta superovulatória e de produção de embriões ovinos (Torrès et al., 1987). Os primeiros estudos com superovulação de ovinos estabeleceram que a maior parte das diferenças na resposta

superovulatória estavam relacionadas com a prolificidade das diferentes raças utilizadas nos programas de MOTE (Cahill & Dufour, 1979), sendo observado que as raças altamente prolíferas respondem melhor a um estímulo com FSH exógeno (Bindon et al., 1971; Smith, 1976).

A diferença racial na resposta superovulatória provavelmente é explicada por uma variação no crescimento folicular, entre raças, em resposta ao FSH exógeno ao invés de diferenças na farmacocinética do FSH (Ammoun et al., 2006). Tais diferenças podem estar relacionadas com a expressão mais elevada ou uma maior sensibilidade dos receptores de FSH no ovário (Driancourt et al., 1986; Dufour et al., 2000). O estabelecimento de um protocolo de superestimulação específico para cada raça, somado a seleção dos indivíduos mais responsivos dentro de cada raça pode futuramente aumentar significativamente o número de embriões de boa qualidade produzidos durante os programas de MOTE.

## **2.5 Repetidas superovulações e coleta de embriões**

O procedimento de coleta de embriões realizado atualmente é feito de forma cirúrgica, semelhantemente ao desenvolvido por Tervit & Havik (1976). A coleta é realizada entre o quinto e o sexto dia após a IA ou monta natural, com uma taxa de recuperação de estruturas em torno de 70% na primeira vez que o animal é submetido ao procedimento. Entretanto, no procedimento cirúrgico, a exteriorização do trato reprodutivo conduz frequentemente à formação de aderências pós-operatórias, induzindo uma queda significativa na produção de embriões depois de repetidas cirurgias (Torrès & Sevellec, 1987).

Estudos em que a superovulação foi induzida duas, três ou cinco vezes durante a mesma estação reprodutiva causou uma redução progressiva no número de ovelhas superovuladas (Al-Kamali et al., 1985; Fuki et al., 1985), bem como uma taxa de ovulação significativamente menor no segundo tratamento (Al-Kamali et al., 1985; Fuki et al., 1985; McKelvey et al., 1986; Torrès & Sevellec, 1987). Esses autores sugerem que a refratariedade do ovário, ou aderências causadas pela recuperação cirúrgica, pode ter efeitos prejudiciais

sobre a taxa de ovulação subsequente quando a superovulação é repetida em intervalos curtos. Uma prática que pode ser adotada, após cada procedimento de coleta, seria manter um tempo para a recuperação cirúrgica e depois permitir uma gestação, por monta natural, em cada doadora.

Devido as desvantagens da técnica convencional de coleta de embriões, foram criadas outras metodologias de coleta que permitem várias coletas da mesma doadora com mínima formação de aderência, como na técnica totalmente laparoscópica (Scudamore et al., 1991; Nellenschulte & Niemann, 1992) ou na semi-laparoscópica (Bari et al., 1999). Contudo, essas técnicas apresentam resultados de recuperação menores do que a técnica cirúrgica. Um refinamento do procedimento semi-laparoscópico aumentou a recuperação de embriões em cerca de 12%, resultando em taxas de recuperação embrionária comparáveis com a abordagem cirúrgica e melhores do que as relatadas para o método laparoscópico (Bari et al., 2000). Outra vantagem dessas técnicas é que atendem melhor os princípios de bem-estar animal.

## **2.6 Anormalidades na ovulação e recuperação embrionária**

Alguns estudos evidenciaram que uma elevada dose de eCG pode causar o desenvolvimento de folículos grandes anovulatórios, que podem se tornar persistentes, provavelmente devido a elevada meia-vida desta gonadotrofina (Jabbour & Evans, 1991; Mahmood et al., 1991, Silva et al., 2003). Tais folículos podem produzir concentrações anormalmente elevadas de estradiol (Jabbour & Evans, 1991), os quais podem afetar o ambiente uterino e, portanto, interferir na captação dos oócitos pelas fímbrias ou com o transporte dos mesmos (Murray et al., 1994) e de espermatozóides ao longo do trato genital feminino (Evans & Armstrong, 1984). Simonetti, et al. (2008) verificaram que alguns protocolos de superovulação apresentaram uma maior taxa de folículos anovulatórios, e isto foi associado a menor recuperação embrionária comparado a tratamentos que apresentaram menor quantidade de folículos anovulatórios. Esses mesmos autores também sugeriram que a

captação de oócitos pelas fímbrias é prejudicada em ovelhas com alta resposta superestimulatória. Isso é consistente com o consenso geral de que a maior estimulação do ovário leva a uma diminuição na produção de oócito e/ou embriões (Armstrong & Evans, 1983; Thompson et al., 1995; D'Alessandro et al., 2005). Outro fator que pode interferir negativamente sobre a captação de oócitos pelas fímbrias, e assim, ocasionar baixa recuperação de embriões após a superovulação de ovelhas, é a manipulação física da ovelha e do útero, bem como a taxa de inflação da cavidade abdominal no momento da IA (Bari et al., 1999).

A superovulação de ovelhas está associada a um elevado grau de regressão prematura de corpo lúteo (RPCL), podendo acontecer em quase 40% das doadoras de embriões (Schiewe et al., 1991). A razão para a ocorrência deste fenômeno não é clara, sendo este acompanhado por uma baixa taxa de recuperação de embriões ou recuperação de embriões de má qualidade (Cognie et al., 2003) ou mesmo nenhuma recuperação (Schiewe et al., 1990),

Lopes Junior et al. (2006), verificaram a ocorrência da regressão em 33% das ovelhas da raça Morada Nova superovuladas, e a mesma ocorreu de forma total ou parcial. Como existem casos de coexistência de corpo lúteo com morfologia e coloração normal e corpo lúteo em regressão, é provável que isso seja uma função do tempo de observação em relação ao início luteólise (Lopes Junior et al., 2006). Portanto, se a laparoscopia é realizada apenas quando o processo luteolítico se inicia, é possível que alguns corpos lúteos já mostrem alterações na morfologia enquanto que outros ainda se apresentem morfológicamente normais, embora todos eles já tenham começado a regredir (Saharrea et al., 1998).

A inibição da síntese de agentes luteolíticos pelo flunixin meglumina entre o dia da ovulação e recuperação de embriões, permite uma redução da RPCL (Battye et al., 1988). A libertação prematura de agentes luteolíticos pode ser induzida pela persistência de grandes folículos estrogênicos entre três e quatro dias após a superovulação. A indução da ovulação dos folículos anovulatórios, três dias após o estro, com gonadotrofina coriônica humana (hCG) evita a RPCL em cabras superovuladas (Saharrea et al., 1998) apoiando esta hipótese. A suplementação alimentar, durante o tratamento superovulatório, também pode ser adotada como ferramenta para reduzir o número de ovelhas com RPCL, uma vez que, a suplementação alimentar com grãos de tremoço, durante a superestimulação reduziu a ocorrência deste problema (Jabbour et al., 1996).

## 2.7 Variabilidade na resposta superovulatória e uso de indutor de ovulação

A variabilidade na resposta superovulatória é o principal fator limitante para os programas de MOTE em pequenos ruminantes (Cognie, 1999). Cerca de 20 a 40% das fêmeas tratadas não respondem ao tratamento de superovulação (D'Alessandro et al., 1996; Cordeiro et al., 2003). Um dos problemas associados com os tratamentos de superovulação é a variabilidade no início do estro após o tratamento e, conseqüentemente, o momento da ovulação. A variação entre os indivíduos conduz a uma diminuição da taxa de fertilização, em especial, após a inseminação em tempo fixo, e, portanto, menos embriões transferíveis são produzidos (Thibier & Guérin, 2000).

Veiga-Lopez et al. (2008) também reforçam que há uma alta variabilidade individual na manifestação do estro, no pico de LH e no momento da ovulação, e isto é capaz de levar a falha na fertilização, dependendo do momento e frequência das inseminações artificiais. Vários fatores contribuem para o aumento no intervalo de tempo entre as ovulações, como ovulações prematuras, o fato de alguns animais levarem muito tempo entre a primeira e última ovulação e também a falta de sincronia no início da superovulação das ovelhas (Walker et al., 1986).

O hormônio liberador de gonadotrofinas e seus análogos (GnRH) tem sido usado por alguns pesquisadores após a estimulação ovariana com FSH, melhorando a sincronia das ovulações (Walker et al., 1986), reduzindo o número de folículos anovulatórios e cistos foliculares (Ryan et al. 1991; Naqvi & Gulyani 1999), elevando a taxa de ovulação (Azawi & Al-Mola, 2011) e produção de embriões viáveis (Menchaca et al., 2009). Apesar do consenso do efeito benéfico do GnRH, ao final do tratamento superovulatório, segundo Jabbour et al. (1996) a administração durante a estação não reprodutiva não melhorou a taxa de ovulação e produção embrionária.

Segundo Walker et al. (1986) a administração de 100 µg de GnRH, 24 horas após a remoção do progestágeno, em ovelhas superestimuladas com múltiplas aplicações de FSH ou com uma única aplicação de eCG, reduz o tempo entre a primeira e última ovulação e o tempo de início das ovulações. Em outro estudo a administração de 50 µg GnRH, também aplicado 24 horas após a remoção do dispositivo de progesterona, levou a ovulação de 44-



46% das ovelhas dentro de 24 horas, e em todos os animais em até 34 horas (Quirke et al., 1979). A maioria dos resultados desses trabalhos indicam que o GnRH pode ser usado nos programas de MOTE para aumentar a taxa de fertilização, e assim aumentar a produção de embriões.

### 3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KAMALI A.A.; BOLAND M.P.; CROSBY T.F.; GORDON I. Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotrophin treatment. **Veterinary Record**. v. 116, p. 180-181. 1985.
- AMIRIDIS, G.S.; C.S.E.H., S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**. v. 130, p. 152-161, 2012.
- AMMOUN, I.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J.M.; CONTRERAS, I.; GONZALEZ AÑOVER, P.; COCERO, M.J.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ- BULNES, A. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**. v. 66, p. 896-905. 2006.
- ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**. v. 19, p. 31-42. 1983.
- AVDI, M.; CHEMINEAU, P.; DRIANCOURT, M.A. Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios sheep. **Animal Reproduction Science**. v. 46, n.3-4, p. 223-235. 1997.
- AZAWI, O.I.; AL-MOLA, M.K.M.A. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulationewes. **Tropical Animal Health and Production**. v. 43, p.1351-1355. 2011.
- AZAWI, O.I.; AL-MOLA, M.K.M.A. A study on superovulation using FSH and eCG in Awassi ewes. **Tropical Animal Health and Production**. v. 42, p.799-801. 2010.
- BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERRELL, B. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a moet programme in sheep. **Theriogenology**. v. 53, p. 727-742. 2000.
- BARI, F.Y.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MERRELL, B.; MURRAY, A.; RICHARDS, R.I.W. An evaluation of the success of MOET in two breeds of hill sheep maintained under normal systems of hill flock management. **Animal Science**. v. 69, p. 367-376. 1999.

- BARIL, G.; POUGNARD, J.L.; FREITAS, V.J.F.; LEBOEUF, B.; SAUMANDE, J. A new method for controlling the precise time of occurrence of the Preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. **Theriogenology**. v. 45, p. 697-706, 1996.
- BARIL, G.; BREDION, P.; CHESNÉ, P. **Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras**. Roma: FAO, 175 p., 1995.
- BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. Review. **Animal Reproduction Science**. v. 124, p. 259-268. 2011.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. **Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 231-244. 2001.
- BATTYE, K.M.; FAIRCLOUGH, R.J.; CAMERON, A.W.N.; TROUNSON, A.O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*capra hircus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 84, p. 425-430. 1998.
- BINDON, B.M.; CHANG T.S.; TURNER H.N. Ovarian response to gonadotrophin by Merino ewes selected for fecundity. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 22, p. 809-820. 1971.
- BOSCOS, C.; SAMARTZI, F.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. **Theriogenology**. v. 58, p. 1261-1272, 2002.
- CAHILL, L.P.; SAUMANDE, J.; RAVVAULT, J.P; BLANC, M.; THIMONIER, J.; MARIANA, J.C. et al. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 62, p. 141-150. 1981.
- CAHILL, L.P.; DUFOUR, J. Follicular population in the ewe under different gonadotrophin levels. **Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**. v. 19, p. 1475-1481. 1979.
- CAMPBELL, K.H.S.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W.; WILRNUT, I. Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. **Theriogenology**. v. 43, p. 181. 1995. (abstract).
- CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S.; Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**. v. 69 (2), p. 167-75. 2008.
- COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**. v. 59, p. 171-188. 2003.
- COGNIE, Y.; BARIL, G. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **INRA Productions Animales**. v. 15, p. 199-207. 2002.
- COGNIE, Y. State of art in sheep and goat embryo transfer. **Theriogenology**. v. 51, p. 105-116. 1999.

- COGNIE, Y.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. **Theriogenology**. v. 25, p. 148. 1986. (abstract).
- CORDEIRO, M.F.; LIMA VERDE, J.B.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; FARIAS, L.N.; SALLES, H.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**. v. 49, p. 19-23. 2003.
- CUETO, M.I.; GIBBONS, A.E.; PEREYRA-BONNET, F.; SILVESTRE, P.; A GONZÁLEZ-BULNES. Effects of Season and Superovulatory Treatment on Embryo Yields in Fine-Wool Merinos Maintained Under Field Conditions. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, p. 770-775, 2011.
- D'ALESSANDRO, A., MARTEMUCCI, G., TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**. v. 63, p. 1764-1774. 2005.
- D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BORGHESE, A.; TERZANO, M.G.; BELLITTI, A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. **Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 255-264. 2001.
- D'ALESSANDRO A.; MARTEMUCCI G.; COLONNA M.A.; CAFUERI C.; TOTEDA, F. Some effects of adding p-LH in defined amounts to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrus ewes. **Animal Reproduction Science**. v. 47, p. 91-98. 1997.
- D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; TOTEDA, F.; GAMBACORTA, M.; MANCHISI, A. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. **Small Ruminant Research**. v. 19, p. 255-261. 1996.
- DATTENA, M.; VESPIGNANI, S.; BRANCA, A.; GALLUS, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; CAPPAL, P. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**. v. 42, p. 235-239. 1994.
- DIEDRICH, K.; DIEDRICH, C.; SANTOS, E.; ZOLL, C.; AL-HASANI, S.; REISSMANN, T. et al. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. **Human Reproduction**. v. 9, p. 788 -791. 1994.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJIN, H.M.; WRENZYCHI, C; KRUIP, T.A.M.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**. v. 57, 5-20. 2002.
- DRIANCOURT, M.A.; FRY, R.C.; CLARKE, I.J.; CAHILL, L.P.; Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 78, p. 565-575. 1986.

- DUFOUR, J.; COGNIE, Y.; MERMILLOD, P.; MARIANA, J.; ROMAIN, R.F. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 118, p. 84-95. 2000.
- EVANS, G.; ARMSTRONG D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 70, p. 47-53. 1984.
- FUKI, Y.; KANO, H.; KOBAYASHI, M.; TETSURA, M.; ONO, H. Response to repeated superovulation treatment in the ewe. **Japanese Journal of Animal Reproduction**. v. 31, p. 155–157. 1985.
- GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M.A. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**. v. 63, p. 2523-2534. 2005.
- GONZALEZ-BULNES, A.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; COCERO, M.J.; GARCIA-GARCIA, R.M.; INSKEEP, E.K.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; MCNEILLY, A.S.; SANTIAGO-MORENO, J.; SOUZA, C.J.; VEIGA-LOPEZ, A.; Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 16, p. 421-435. 2004.
- GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J.; DOMÍNGUEZ, V.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on response to superovulatory FSH treatment in ewes. **Theriogenology**. v. 60, p. 281-288. 2003.
- GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SOUZA, C.J.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. **Theriogenology**. v. 58, p. 1607-1614, 2002a.
- GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SOUZA, C.J.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J.; BAIRD, D.T. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 37, p. 357-361. 2002b.
- GONZALEZ-BULNES, A., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M.J., LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in spanish merino ewes. **Theriogenology**. v. 54, p.1055–1064. 2000.
- GOTO, K.; OHKOT SUS; NAKANISHI; Y. OGAWA, K.; TASAKI, M.; INOHAE, S. et al. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black Cattle. **Theriogenology**. v. 29, p. 615-629. 1988.
- GREYLING, J.P.C.; KOTZE, W.F.; TAYLOR, G.J.; HANGENDIJK, W.J.; CLOETE, F.; Synchronization of oestrus in sheep: use of different doses of progestagen outside the normal breeding season. **South African Journal of Animal Science**. v. 24, p.33–37. 1994.

- HEIDARI, F.; GHARAGOZLOO, F.; VOJGANI, M.; FARROKHI, N.; VAJHI A.R.; MASOUDIFARD M.; MIRTORABI, M.; NAYERI FASAEI, B. The effect of a GnRH antagonist pre-treatment, in the superovulation of goats, **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 140-143, 2010.
- HIEMSTRA, S.J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS H., The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Eds). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. FAO: Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/a0399e/a0399e00.htm>>. Acesso em: 29/01/2013.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE. T.; Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v. 47, 23-32. 1997.
- IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. 2011. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P>> Acesso em: 17/01/2013.
- JABBOUR, H.N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. **Animal Reproduction Science** . v. 24, p. 259-270. 1991.
- JABBOUR, H.N.; RYAN J.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 3, p. 699-707. 1996.
- KAKAR, M.A.; MADDOCKS, S.; LORIMER, M.F.; KLEEMANN, D.O.; RUDIGER, S.R.; HARTWICH, K.M.; WALKER, S.K. The effect of periconception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. **Theriogenology**. v. 64, p. 1090-1103. 2005.
- KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, E.; LEIDING, C.; NOHNER, H.P.; POHLAND, R.. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. **Reproduction Nutrition Development**. v. 42, p. 587-599. 2002.
- LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**. v. 50, p. 395-416. 1998.
- LOPES JÚNIOR, E.S.; MAIA E.L.M.M.; PAULA, N.R.O.; TEIXEIR, D.I.A.; VILLARROEL; A.B.S.; RONDINA D.; FREITAS, V.J.F. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 38, p. 555-561. 2006.
- LOPEZ-ALONSO, C.; ENCINAS, T.; GARCIA-GARCIA, R.M.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J.M.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Administration of single short-acting doses of GnRH antagonist modifies pituitary and follicular function in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 29, p. 476-487. 2005.

- LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; MORENO, J. S. Control y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. In: XXIX Curso Internacional de Reproducción animal, 29., 2006, Madrid, **Compendio de Conferencias...** Madrid, p.43-52, 2006.
- MAHMOOD, S.; KOULD, G.L.; BISWAS, J.C. Comparative efficacy of FSH-P and PMSG on superovulation in Pashmina goats. **Theriogenology**. v. 35, p. 1191-1196. 1991.
- MARTEMUCCI, G.; D'ALESSANDRO, A.; TOTEDA, F.; FACCIOLONGO, A.M.; GAMBACORTA, M. Embryo production and endocrine response in the ewe superovulated with PMSG with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. **Theriogenology**. v. 44, p. 691-703. 1995.
- MAYORGA, I.; MARA, L.; SANNA, D.; STELLETTA, C.; MORGANTE, M.; CASU, S.; DATTENA, M. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. **Theriogenology**. v. 75, p. 1661-1668. 2011.
- MCKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; ROBERTSON, I.S.; Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. **Theriogenology**. v. 25, p. 855-865. 1986.
- MENCHACA, A.; VILARINÕ, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**. v. 72, p. 477-483. 2009.
- MOOR, R.M.; OSBORN, J.C.; CROSBY, I.M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 74, p. 167-172. 1985.
- MURRAY, J.F.; DOWNING, J.A.; SCARAMUZZI, R.J.; EVANS, G. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. **Theriogenology**. v. 42, p. 1337-1347. 1994.
- NAQVI, S.M.K.; GULYANI, R. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. **Small Ruminant Research**. v. 34, p. 127-131. 1999.
- NASSER, L.F.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; REZENDE, C.R.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. v. 76, p. 320-327. 2011.
- NELLENSCHULTE, E.; NIEMANN, H. Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy. **Animal Reproduction Science**. v. 27, p. 293-304. 1992.
- NEVES, J.P.; RAMOS, A.F.; SILVA, B.D.M. Alternatives to estrus synchronization and superovulation in ewes in the tropics. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 38 (Supl 2), p. s337-s369. 2010.
- NOWSHARI, M.; BACKERS, J.; HOLTZ, W. Superovulation of goats with purified pFSH supplemented with defined amounts of pLH. **Theriogenology**. v. 43, p. 797-802. 1995.

- QUIRKE, J.R., JENNINGS, J.J., HANRAHAN, J.P.; GOSLING, J.P. Oestrus, time of ovulation, ovulation rate and conception rate in progestagen-treated ewes given Gn-RH, Gn-RH analogues and gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 56, p. 479-188. 1979.
- REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P. A.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1ed. São Paulo: Varela, 2002, p. 127-177.
- REISSMANN, T.; FELBERBAUM, R.; DIEDRICH, K.; ENGEL, J.; COMARU-SCHALLY, A.M.; SCHALLY, A.V. Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. **Human Reproduction**. v. 10, p. 1974-1981. 1993.
- RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S.; CARBAJAL, B.; BENQUET, N.; PINCZAK, A. Superovulatory response to FSH treatments after different progesterone primings in ewes. **Small Ruminant Research**. v. 33, p. 159-164, 1999.
- RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; DE CASTRO, T.; CARBAJAL, B. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**. v. 43, p. 465-472. 1995.
- RYAN, J.P.; HUNTON, J.R.; MAXWELL, W.M. Increased production of sheep embryos following superovulation of merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. **Reproduction, Fertility, and Development**. v. 3, p. 551-560. 1991.
- SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCAZAR, A.; MEJIA, O.; CERBON, J.L.; CABALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**. v. 50, p. 1039-1052. 1998.
- SCARAMUZZI, R.J.; DOWNING, J.A.; CAMPBELL, B.K.; COGNIE, Y. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. **Australian journal of biological sciences**. v. 41, p. 37-45. 1988.
- SCHIEWE, M.C.; FITZ, T.A.; BROWN, J.L.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin-F2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 93, p. 19-30. 1991.
- SCHIEWE, M.C.; HOWARD, J.G.; GOODROWE, K.L.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2alpha synchronization is compromised by premature luteal regression. **Theriogenology**. v. 34, p. 469-486. 1990.
- SCUDAMORE, C.L.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; ROBERTSON, I.S. The effect of method of oestrous synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. **Animal Reproduction Science**. v. 34, p. 127-133, 1993.



- SCUDAMORE C.L.; ROBINSON J.J.; AITKEN, R.P.; KENNEDY, D.J.; IRELAND, S.; ROBERTSON, I.S. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. **Theriogenology**. v. 35, p. 329-337, 1991.
- SHAPIRO, D.B. GnRH antagonists. **Fertility and Sterility**. v. 80 (suppl. 1), p. S1-S7. 2003.
- SHARMA, V.K.; GUPTA R.C.; KHAR, S.K.; KHURANA N.K. Plasma progesterone profiles, ovarian response and embryo recovery in crossbred ewes superovulated during breeding and non-breeding seasons. **Animal Reproduction Science**. v. 34, p. 119-126. 1993.
- SILVA, B.D.M.; SARTORI, R.; SILVA, T.A.S.N.; CARDOZO, D.M.M.; OLIVEIRA, M.A.L.O.; NEVES, J.P. Sincronização de estro com prostaglandina f2 $\alpha$  versus progestágeno associado à gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ovelhas Santa Inês no Distrito Federal, Brasil. **Ciências Animais**. v. 11, n. 2, p. 417-424. 2010
- SILVA, J.C.; COSTA, L.L.; CIDADAO, R.; SILVA, J.R. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. **Theriogenology**. v. 60, p. 521-532. 2003.
- SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O.E.; CAROU, N.; ALBERIO, R.H.; ABECIA, J.A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**. v. 104, p. 227-237. 2008.
- SMITH, J.F. Selection for fertility and response to PMSG in Romney ewes. **Proceedings: New Zealand Society of Animal Production**. v. 36, p. 247-251. 1976.
- SOLTI, L.; CRICHTON, E.G.; LOSKUTOFF, N.M.; CSEH, C. Economical and ecological importance of indigenous livestock and the application of assisted reproduction to their preservation. **Theriogenology**. v. 53, p. 149-162. 2000.
- TERVIT, H.R.; HAVIK, P.G. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 24, p. 138-140. 1976.
- THEODOSIADOU, E.; GOULAS, P.; KOUSKOURA, T.H.; SMOKOVITIS, A. Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. **Animal Reproduction Science**. v. 80, p. 59-67. 2004.
- THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Embryo transfer in small ruminants: The method of choice for health control in germplasm exchanges. **Livestock Production Science**. v. 62, p. 253-270. 2000.
- THOMPSON, J. G. E.; SIMPSON, A. C.; JAMES, R. W.; TERVIT, H. R. The application of progesterone-containing CIDRTM devices to superovulated ewes. **Theriogenology**. v. 33, p. 1297-1304. 1990.
- THOMPSON, J.G.; BELL, A.C.S.; MCMILLAN, W.H.; PETERSON, A.J.; TERVIT, H.R. Donor and recipient ewe factors affecting in vitro development and post-transfer survival of cultured sheep embryos. **Animal Reproduction Science**. v. 40, p. 269-279. 1995.

- TORRÈS, S.; COGNIE, Y.; COLAS, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. **Theriogenology**. v. 27, p. 407-419. 1987.
- TORRÈS, S.; SEVELLEC C. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**. v. 27, p. 859-863. 1987.
- VEIGA-LOPEZ, A.; DOMINGUEZ, V.; SOUZA, C.J.H.; GARCIA-GARCIA, R.M.; ARIZNAVARRETA, CARMEN.; TRESGUERRES, J.A.F.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Features of follicle-stimulating hormone stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles, **Fertility and Sterility**. v. 89, p. 1328-1337, 2008.
- VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**. v. 51, p. 1351-1361. 1999.
- WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; SEAMARK, R.F. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 77, p. 135-142. 1986.
- WHYMAN, D.; MOORE, R.W. Effects of PMSG and the PGF2a analogue, Cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 60, p. 267-272. 1980.
- WU, W.; HANIKEZI; YANG, M.; GONG, P.; WANG, F.; TIAN, Y.; XU, X.; FU, X.; HAQIKEZI; TIAN, K.; GUO, Z. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n.70, p. 15834-15837. 2011.

## **CAPÍTULO 2**

### **MAIOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA ASSOCIADO AO USO DE AGONISTA DE GnRH NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS**

## 1 RESUMO

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) vêm evoluindo ao longo dos últimos anos, contudo ainda existe uma grande variabilidade na resposta superovulatória e produção embrionária que limita o sucesso desta tecnologia na ovinocultura. Um aumento da qualidade folicular e oocitária associado a uma maior controle do momento das múltiplas ovulações poderia ser benéfico para aumentar o número de embriões produzidos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da maior exposição à progesterona exógena, durante a superestimulação, associado ou não a adição de agonista de GnRH sobre a resposta superovulatória, produção e qualidade embrionária, usando sêmen congelado. Quarenta e oito fêmeas da raça Santa Inês, foram sincronizadas com a inserção de um implante intravaginal (CIDR). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: exposição à progesterona por 14 dias (Controle; n = 14); prolongamento de 12 horas na exposição à progesterona (G12hP4; n = 21); e prolongamento de 12 horas associado a uma aplicação de 25 µg de lecirelina (G12hP4GnRH; n = 13). Para superestimulação, 133 mg de pFSH foram administradas em doses decrescentes em 8 aplicações. A resposta superestimulatória e a quantidade de folículos grandes ainda não ovulados foram avaliadas por ultrassonografia (US), ao final do tratamento com FSH e 12 horas após a segunda inseminação artificial (IA), respectivamente. O estro foi detectado com auxílio de rufiões após a remoção do CIDR, e as inseminações foram realizadas 36 e 48 horas após a retirada do mesmo, usando sêmen congelado ( $100 \times 10^6$  epz/dose). Cinco dias após a primeira inseminação, o número de corpos lúteos (CL) foi avaliado por laparoscopia e os embriões colhidos por laparotomia pré-púbica. A quantidade de ovelhas em estro e o tempo de início do estro após a remoção do dispositivo de progesterona foi semelhante entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Todos os grupos tiveram uma elevada resposta superestimulatória (médias variando de 14,33 a 16,18 folículos  $\geq 4$  mm) ( $P > 0,05$ ). O número de CL foi elevado em todos os grupos

(variação de 11 a 12) ( $P > 0,05$ ). O percentual de fertilização foi maior ( $P < 0,05$ ) no G12hP4GnRH do que no Controle e G12hP4 (77%, 34%, e 41%, respectivamente). O maior tempo de exposição à progesterona reduziu ( $P < 0,05$ ) a proporção de embriões degenerados (Controle = 30%; G12hP4 = 7% e GP12hP4GnRH = 10%). A associação do aumento da exposição à progesterona com administração de GnRH reduziu a degeneração embrionária e aumentou a fertilização dos oócitos, podendo ser adotada nos programas de MOTE.

Palavras chaves: produção embrionária, Santa Inês, superestimulação, FSH.

## **2 ABSTRACT**

### **LONGER EXPOSURE TO PROGESTERONE ASSOCIATED WITH GnRH AGONIST FOR SUPEROVULATION AND EMBRYO PRODUCTION IN SHEEP**

Multiple ovulation and embryo transfer programs (MOET) have been evolving over the past few years, however there is still wide variability in superovulatory response and embryo production which limits this technology success of for the sheep industry. An increase in follicular and oocyte quality associated with a control of multiple ovulations moment could be beneficial to increase the produced embryos number. This study aimed to evaluate the effect of increased the exposure time to exogenous progesterone during overstimulation, with or without the addition of GnRH agonist at superovulatory response. For the experiments of embryo production and to access the quality frozen semen was used. Forty-eight Santa Ines ewes were synchronized with intravaginal insertion of progesterone implant (CIDR). The animals were randomly divided into three groups: exposure to progesterone for 14 days (Control, n = 14); extension of 12 hours progesterone exposure (G12hP4, n = 21); and 12 hours extension associated with an application of 25 µg of Lecirelin (G12hP4GnRH, n = 13). For overstimulation, 133 mg of pFSH in decreasing doses were administered in eight applications. Superstimulatory response and large follicles amount that has not ovulated were evaluated by ultrasonography (US), after the treatment with FSH and 12 hours after the second artificial insemination (AI), respectively. Estrus was detected with the aid of thugs after CIDR removal and inseminations were performed 36 and 48 hours after removal, using frozen semen ( $100 \times 10^6$  spz/dose). Five days after the first insemination, the number of corpora lutea (CL) was measured by laparoscopy and the embryos were collected by prepubic laparotomy. The amount of oestrus ewes and time of onset of estrus after device removal of

progesterone was similar between groups ( $P > 0.05$ ). All groups had a high superstimulatory response (averages ranging from 14.33 to 16.18 follicles  $\geq 4$  mm) ( $P > 0.05$ ). The number of CL was high in all groups (averages ranging from 11 to 12.00) ( $P > 0.05$ ). The fertilization rate was significantly higher in the G12hP4GnRH compared to the Control and G12hP4 (77%, 34% and 41%), respectively. The longer exposure to progesterone reduced degenerated embryos proportion (Control = 30%; G12hP4 = 7% and G12hP4GnRH = 10%). The association of increased progesterone exposure time and GnRH administration reduces embryonic degeneration and increased oocytes fertilization rates and it may be adopted at MOET programs.

Keywords: embryos, conservation, superstimulation, FSH.

### 3 INTRODUÇÃO

Os ovinos tem uma significativa contribuição para a produção global de alimentos. Esses animais apresentam um papel enfático, principalmente para as economias dos países em desenvolvimento e, em particular, para aqueles com condições climáticas desfavoráveis, ou com terras na sua maioria subférteis. No Brasil o rebanho ovino é formado por aproximadamente 17,6 milhões de cabeças (IBGE, 2011), sendo a raça Santa Inês a mais criada nas diferentes regiões por apresentar características como alta rusticidade, fertilidade e precocidade (Silva et al., 2010). Contudo, muitos animais ainda exibem baixos índices zootécnicos e outras raças localmente adaptadas apresentam-se ameaçadas de extinção. Dessa forma a adoção de tecnologias de reprodução assistida (TRA), como a produção in vivo de embriões, é uma tecnologia importante para o melhoramento genético e para o resgate e conservação *ex situ*, em bancos de germoplasma, de raças localmente adaptadas e ameaçadas de extinção.

Os Bancos de Germoplasma constituem um recurso fácil e de grande importância na preservação do germoplasma das raças naturalizadas. Pela criopreservação de sêmen e de embriões poder-se-á, no futuro, resgatar populações que por algum motivo possam ter se extinguido e que tenham importantes características para a pecuária nacional. Dessa forma há a possibilidade de buscar a variabilidade necessária e características de adaptabilidade às intempéries da natureza, com vista a aumentar a produção ou acrescentar genes de interesse econômico às raças comerciais (Hiemstra et al., 2006). A criopreservação de embriões permite a conservação do germoplasma de fêmeas, além de permitir o intercâmbio deste material para outras regiões ou países, com o mínimo risco de transmissão de doenças (Baril et al., 1995).



Apesar dos avanços nos últimos anos, ainda há uma variabilidade na produção *in vivo* de embriões ovinos, que possivelmente está relacionada à elevada variação na resposta superovulatória, que limita a difusão desta tecnologia (Sharma et al., 1993; Cognie et al., 1999; Cognie & Baril, 2002). O tratamento superestimulatório e a diferença na composição dos preparados de hormônio folículo estimulante (FSH) disponível comercialmente são apontados como algumas das causas (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; D'Alessandro et al., 2005). O sucesso da resposta ovariana ao tratamento superovulatório também é dependente de fatores como a condição folicular, a genética, a estação do ano e o estado nutricional dos animais (Gonzalez-Bulnes et al., 2003; Kakar et al., 2005; Ammoun et al., 2006). Esses fatores podem agir direta ou indiretamente influenciando a qualidade oocitária/embrionária e/ou a sincronia das múltiplas ovulações.

Para o desenvolvimento de um embrião saudável é necessário que o oócito adquira competência, e isto ocorre entre o final da fase de crescimento e início da fase de maturação oocitária, por meio de mudanças estruturais e moleculares (Hyttel et al., 1997; Dieleman et al., 2002). Entretanto, durante o fim do tratamento superestimulatório é possível que existam oócitos que não adquiriram a competência completa. Portanto, acredita-se que uma exposição prolongada à progesterona durante a superestimulação com FSH iniba por um maior tempo o pico de LH. Isso possivelmente permitiria que os folículos que contenham oócitos ainda não competentes venham a desenvolver competência, e assim, produzam embriões viáveis.

Além disso, o uso do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou seus agonistas, após a estimulação com FSH, proporciona uma boa sincronia das ovulações e maior produção de embriões (Walker et al., 1986; Menchaca et al., 2009), apesar de alguns relatos controversos (Baril et al., 1996; Jabbour et al., 1996).

A adoção de estratégias como um maior tempo de exposição à progesterona exógena associada à indução da ovulação parece ser uma alternativa viável para melhorar a taxa de fertilização oocitária e qualidade embrionária principalmente quando é empregado sêmen congelado nas inseminações em tempo fixo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da maior exposição à progesterona exógena, durante a superovulação, associado ou não a adição de agonista de GnRH como indutor de ovulação sobre a resposta superovulatória, produção e qualidade embrionária, usando sêmen congelado.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este Experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob protocolo UnBDOC no. 99694/2012.

### **4.1 Local do Experimento**

O estudo foi realizado, no período de maio a julho de 2012, no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira, pertencente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado a sudoeste da cidade de Brasília, DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02'W), com altitudes que variam de 1050 a 1250m. O clima predominante é o tropical chuvoso, indicando inverno seco e verão chuvoso. A fazenda conta com uma área total de 118 ha, distribuída em áreas de cerrado, pastagem e agricultura (Walter & Sampaio, 1998).

## 4.2 Animais e tratamentos

Foram usadas 48 fêmeas ovinas adultas da raça Santa Inês, consideradas híginas após realização de exame clínico geral. Os animais foram submetidos à avaliação ginecológica, por meio de inspeção e diagnóstico por imagens, na qual todas foram consideradas aptas para a reprodução. Os animais foram mantidos em pasto de *Panicum maximum*, e tiveram livre acesso à água e sal mineral.

Todas as fêmeas foram sincronizadas com a inserção de um implante intravaginal (Dia 0) contendo 0,3 g de progesterona (Eazi- Breed CIDR™ - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia), que foi substituído por um novo, sete dias depois (Dia 7), e mantido por mais sete dias (Dia 14). No momento da troca do CIDR foi aplicado 37,5 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina), por via intramuscular.

Para superestimulação, 133 mg de pFSH (Folltropin®, Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc., Canadá) foram administrados em doses decrescentes em 8 aplicações, duas vezes ao dia, iniciando na manhã do Dia 12 e encerrando na tarde do Dia 15. No Dia 14 do protocolo, as ovelhas foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais: progestágeno retirado à tarde (Controle; n=14); mantido por mais 12 horas (G12hP4; n=21); e além do prolongamento de 12 horas de exposição a progesterona uma aplicação de 25 µg de lecorelina, agonista de GnRH (Gestran Plus®, Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina), juntamente com a última aplicação de FSH (G12hP4GnRH; n = 13) (Figura 1).

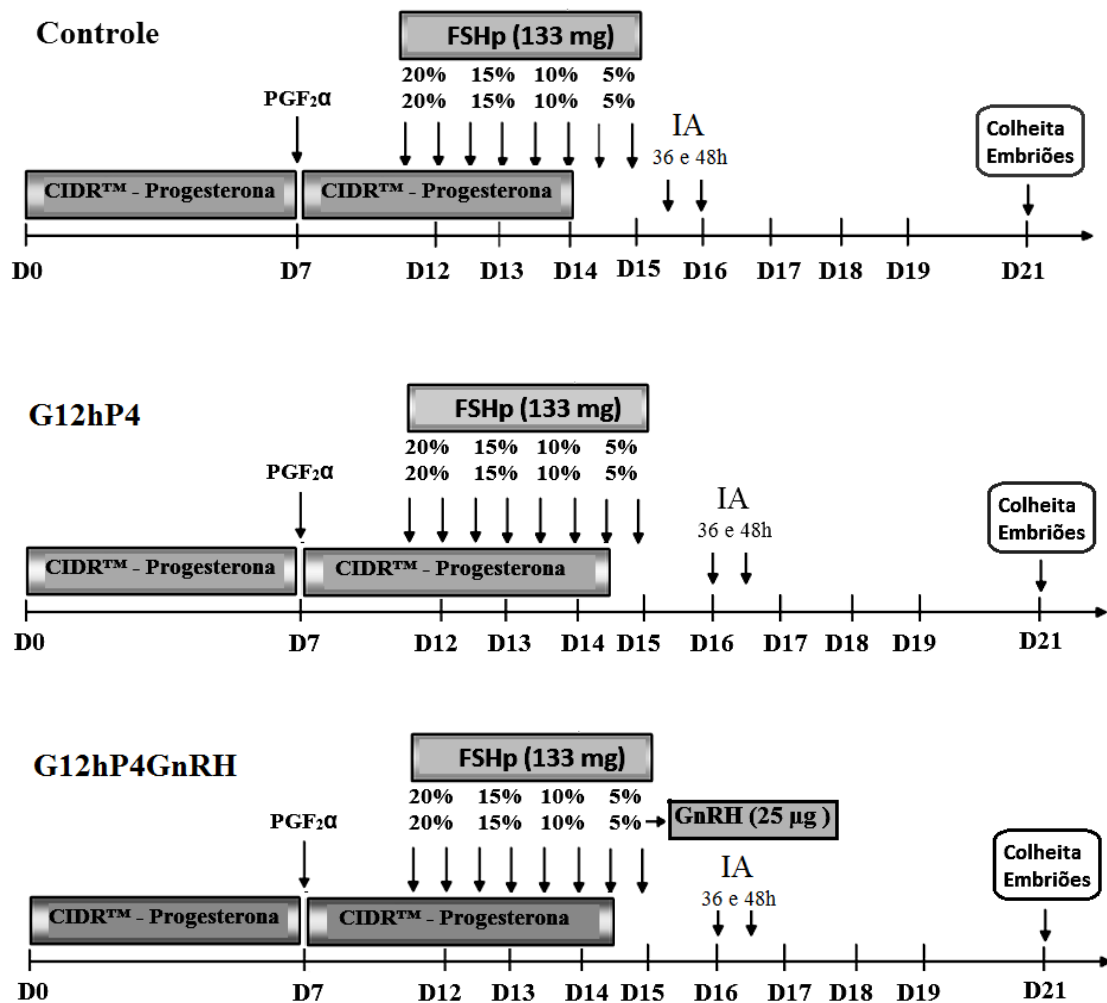


Figura 2.1 Protocolos hormonais destinados à superovulação das ovelhas Santa Inês doadoras de embriões.

#### 4.3 Avaliação da resposta superestimulatória e superovulatória

Foram realizadas duas avaliações ultrassonográficas dos ovários de todas as fêmeas, usando scanner modo-B em tempo-real (Aloka SSD 500 Echo Camera, Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC, Canadá) e transdutor de 7,5 MHz adaptado para exame transretal. O primeiro exame foi realizado após a última aplicação de FSH para avaliar a resposta superestimulatória presente no fim do tratamento gonadotrófico. O segundo exame foi realizado 12 horas após a última IA com a finalidade de avaliar a quantidade de folículos

grandes ainda não ovulados. Todos os folículos capazes de ovularem ( $\geq 4$  mm) (Salehi et al., 2010) foram quantificados e desenhados em mapas.

Cinco dias após a primeira inseminação, momento que precedeu a coleta dos embriões, o número de corpos lúteos (CL) foi avaliado por laparoscopia. Os CL foram classificados como normais ou prematuramente regredidos de acordo com a cor e condição de desenvolvimento.

#### **4.4 Avaliação do estro**

A detecção do estro foi realizada após a remoção do dispositivo de progesterona. As ovelhas foram colocadas em uma baia coletiva com a presença de um rufião que teve a região peitoral pintada com uma mistura de tinta xadrez e óleo de soja. As identificações das fêmeas marcadas foram realizadas em intervalos de quatro horas, até o dia da primeira inseminação artificial, detectando assim o momento inicial do estro e a sincronia deste. Todas as ovelhas marcadas na região da garupa foram consideradas em estro, sendo retiradas da presença do rufião.

#### **4.5 Inseminação artificial**

As inseminações foram realizadas pelo método de laparoscopia descrito por Maxwell & Butler (1984), as 36 e 48 horas após a retirada do CIDR, usando  $100 \times 10^6$  espermatozoides/dose com os parâmetros mínimos para o uso de sêmen congelado, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Previamente as

ovelhas foram submetidas a um jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 horas, respectivamente. No momento da inseminação as fêmeas foram colocadas em uma maca cirúrgica apropriada, em posição de *Trendelenburg*. No campo cirúrgico, região abdominal cranial ao úbere, foi realizado tricotomia e antissepsia com tintura de iodo a 2% e álcool 70%, e em seguida feito anestesia local infiltrativa na dose de 0,04 mg de cloridrato de lidocaína (Lidovet™, Bravet, Brasil) por botão anestésico, no local em que foram introduzidos os trocartes. O sêmen foi depositado na porção médio-distal de cada corno uterino, utilizando metade da dose inseminante em cada corno.

#### **4.6 Coleta de embriões**

As fêmeas foram previamente mantidas em jejum alimentar e hídrico de 24 horas, e então, colocadas em maca cirúrgica apropriada em posição de *Trendelenburg*. Todos os animais receberam como medicação pré-anestésica 0,11 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompun™, Bayer, Brasil) e anestesia geral com 0,6 mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina™, Agener, Brasil), via intramuscular.

No campo cirúrgico destinado aos procedimentos de laparoscopia e laparotomia, foi feito a tricotomia e antissepsia com tintura de iodo 2% e álcool 70%, seguida por anestesia local infiltrativa, na dose de 0,04 mg de cloridrato de lidocaína, em cada ponto onde foram introduzidos os trocartes. Somente as ovelhas que apresentaram  $\geq 3$  CL, com morfologia normal na avaliação da resposta superovulatória, foram submetidas a coleta de embriões. Nessas foi realizada anestesia infiltrativa na dose de 0,2 mg de cloridrato de lidocaína na linha média, e posterior incisão de aproximadamente 8 cm da parede abdominal. Após identificação, tracionamento cuidadoso e exposição dos cornos uterinos, teve início à lavagem.

Para o procedimento de lavagem, uma sonda “foley” nº 8 ou 10, de acordo com o tamanho do útero, foi introduzida na porção proximal de cada corno uterino, tendo o balão inflado para evitar refluxo de líquido. Na porção distal, próxima à junção útero-tubárica foi

colocado um cateter nº 20G, por onde o meio tampão fosfato salina (PBS) suplementado com 1% de soro fetal bovino, previamente aquecido a 37°C foi introduzido. Foi usado um volume total de 60 mL de meio de lavagem por corno uterino.

O líquido recuperado foi armazenado em placas de Petri e em seguida, foi realizada a avaliação das estruturas recuperadas. Após as lavagens dos cornos, o interior da cavidade abdominal foi irrigado com solução heparinizada, com a finalidade de minimizar a formação de aderências. A sutura das camadas muscular, subcutânea e dérmica foi realizada após o procedimento de coleta.

#### **4.7 Avaliação embrionária e resposta superovulatória**

As estruturas recuperadas foram avaliadas em aumento de 20 a 50X em estéreo-microscópio. Quando encontradas foram transferidas para gotas de meio de manutenção (Holding plus™, 0,4% BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil) para posterior avaliação. Os embriões coletados foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade seguindo os parâmetros morfológicos preconizados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (Robertson e Nelson, 1999). Estadio de desenvolvimento: mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e blastocisto eclodido em expansão. Qualidade: grau I (excelente ou bom): massa embrionária esférica e simétrica com células individuais uniformes no tamanho, cor e densidade; grau II (regular): moderadas irregularidades na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade de células individuais; grau III (pobre), maiores irregularidades na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade de células individuais; grau IV (morto ou degenerado): embriões em processo degenerativo e embriões de uma célula.

Foram calculados os índices para cada grupo: taxa de recuperação (total de estruturas recuperadas/número CL); taxa de fertilização (total de embriões/estruturas

recuperadas); taxa de embriões congeláveis (embriões congeláveis/embriões viáveis); taxa de degenerados (embriões degenerados/total de embriões).

#### **4.8 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS (V9, SAS Institute Inc, Cary, NC, 2003). Os parâmetros relativos à quantidade de folículos na última aplicação de FSH e 12 horas após a IA, número de corpos lúteos e o número total de estruturas coletadas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). As variáveis que não apresentaram distribuição normal, como o número de embriões viáveis e congeláveis foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados como a porcentagem de fêmeas que exibiram estro, resposta superovulatória, assim como, a taxa de recuperação, fertilização, embriões congeláveis e degeneração embrionária foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. Os resultados estão apresentados em Média  $\pm$  Desvio Padrão ou porcentagem, e as diferenças foram consideradas significativas quando o  $P < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

Todos os grupos manifestaram alta taxa de estro, não havendo efeito ( $P>0,05$ ) da maior exposição à progesterona, associado ou não ao GnRH, sobre o número de ovelhas em estro e tempo de início do estro após a remoção do dispositivo de progesterona (Tabela 2.1).

Considerando que as fêmeas que responderam ao tratamento superovulatório apresentaram uma quantidade  $\geq 3$  corpos lúteos com morfologia e coloração normal, um número significativamente menor de doadoras do G12hP4 em relação aos grupo controle e G12hP4GnRH, foram consideradas superovuladas. A regressão prematura dos corpos lúteos (RPCL) foi verificada em menos de 10% dos animais tratados (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Efeito da maior exposição à progesterona com ou sem agonista do GnRH sobre o comportamento de estro e resposta ovulatória das doadoras Santa Inês

	<b>Controle</b>	<b>G12hP4</b>	<b>G12hP4GnRH</b>
<b>Comportamento do estro</b>			
Ovelhas em estro	14/14 (100%)	18/21 (85,7%)	12/13 (92,3%)
Remoção do CIDR ao estro (h)	21 $\pm$ 4,37	20 $\pm$ 7,11	23 $\pm$ 5,70
<b>Resposta das doadoras</b>			
Ovelhas com RPCL <sup>1</sup>	1/14 (7,1%)	2/21 (9,5%)	0/14 (0%)
Doadoras superovuladas ( $\geq 3$ CL)	12/14 (85,7%) <sup>a</sup>	11/21 (52,4%) <sup>b</sup>	11/13 (84,6%) <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Regressão prematura de corpo lúteo  
( $P>0,05$ )

Todos os grupos tiveram uma elevada resposta superestimulatória, com médias variando entre 14,33 e 16,18 folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro, e superovulatória, com média variando entre 11,11 e 12,00 corpos lúteos ( $P > 0,05$ ). A quantidade de folículos ainda não ovulados 12 horas após a última inseminação não diferiu entre os grupos ( $P > 0,05$ ). A taxa de ovulação foi menor em G12hP4GnRH do que nos demais grupos ( $P < 0,05$ ), que não diferiram entre si (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Efeito da maior exposição à progesterona com ou sem agonista do GnRH sobre a resposta ovariana

	Controle	G12hP4	G12hP4GnRH
<b>Resposta ovariana</b>			
Folículos ( $\geq 4$ mm) <sup>1</sup>	14,33 $\pm$ 5,84	15,22 $\pm$ 5,87	16,18 $\pm$ 7,36
Folículos após a IA ( $\geq 4$ mm) <sup>2</sup>	5,50 $\pm$ 2,81	5,78 $\pm$ 1,86	5,00 $\pm$ 3,22
Corpos Lúteos	12,00 $\pm$ 6,48	11,11 $\pm$ 5,64	11,81 $\pm$ 7,6

<sup>1</sup> Quantidade de folículos  $\geq 4$  mm na última administração de FSH

<sup>2</sup> Quantidade de folículos  $\geq 4$  mm 12 horas após a última IA

O número total de estruturas coletadas, embriões viáveis e congeláveis e o percentual de embriões congeláveis foram semelhantes entre os grupos ( $P > 0,05$ ). A taxa de recuperação embrionária foi maior ( $P < 0,05$ ) no Grupo G12hP4 do que no Controle e G12hP4GnRH. O percentual de fertilização foi maior ( $P < 0,05$ ) no Grupo G12hP4GnRH do que no Controle e G12hP4. O maior tempo de exposição à progesterona reduziu ( $P < 0,05$ ) a proporção de embriões degenerados (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Efeito da maior exposição à progesterona com ou sem agonista do GnRH sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês

	Controle	G12hP4	G12hP4GnRH
<b>Produção de embriões</b>			
Total de estruturas	4,83 $\pm$ 3,86	6,89 $\pm$ 5,06	4,36 $\pm$ 3,26
Embriões viáveis	1,17 $\pm$ 1,70	2,55 $\pm$ 2,77	2,91 $\pm$ 2,59
Embriões congeláveis	0,92 $\pm$ 1,51	1,91 $\pm$ 2,63	2,27 $\pm$ 2,20
Recuperação (%)	58/144 (40) <sup>b</sup>	74/123 (60) <sup>a</sup>	48/130 (37) <sup>b</sup>
Fertilização (%)	20/58 (34) <sup>b</sup>	30/74 (41) <sup>b</sup>	37/48 (77) <sup>a</sup>
Embriões congeláveis (%)	11/14 (79)	21/28 (75)	25/32 (78)
Embriões degenerados (%)	06/20 (30) <sup>b</sup>	02/28 (7) <sup>a</sup>	05/32 (10) <sup>ab</sup>

<sup>a, b</sup> Valores dentro da mesma linha com letras sobscritas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que os tratamentos empregados foram eficientes em induzir o estro na grande maioria das ovelhas Santa Inês. As ovelhas identificadas em estro, em todos os grupos, apresentaram uma variação de 12 a 32 horas, após a remoção do CIDR para o início do comportamento estral, tendo médias entre 20 a 23 horas. Como a avaliação do estro foi realizada durante 36 horas após a retirada do CIDR, alguns animais podem ter vindo a manifestar o estro mais tardiamente. Um fato importante é que todos os animais que não foram verificados em estro também não apresentaram resposta superovulatória. O curto período de observação do estro favorece os animais com resposta superestimulatória, que reconhecidamente apresentam uma manifestação de estro precoce após a remoção do dispositivo de progesterona. A importância da avaliação do estro é que este evento está associado com o pico de LH e com as ovulações (Gonzalez-Bulnes et al., 2002b).

A ausência de resposta superovulatória (< 3 ovulações) foi aproximadamente 15%, no Controle e G12P4GnRH, enquanto que no G12hP4, cerca de 48% das fêmeas não responderam ao tratamento superovulatório. Alguns trabalhos mostram variações entre 20 a 40% de fêmeas que não respondem ao tratamento superestimulatório (D'Alessandro et al., 1996; Cordeiro et al., 2003). A maior quantidade de fêmeas não responsivas no G12hP4 provavelmente se deve a diferenças individuais que ocorrem mesmo dentro da mesma raça (Cognie, 1999; Ammoun et al., 2006), uma vez que o aumento de exposição a P4 não justifica a maior quantidade de fêmeas não responsivas neste grupo, confirmado pela pequena taxa de animais não responsivos verificada no G12P4GnRH que também teve exposição a P4 prolongada.

A regressão prematura de corpos lúteos (RPCL) no presente estudo não foi um problema associado à superovulação, uma vez que, as taxas foram baixas em todos os grupos. Resultados semelhantes também foram verificados por Cordeiro et al. (2003), onde também foram utilizadas ovelhas da raça Santa Inês em programa de superovulação. Contrariamente, alguns trabalhos demonstram que a RPCL pode ocorrer em uma grande quantidade das doadoras (~40%) (Schiewe et al., 1991; Lopes Junior et al., 2006), entretanto, a razão para a ocorrência desse fato não é clara (Cognie et al., 2003).

A alta resposta superestimulatória encontrada na última aplicação de FSH mostrou que a dose de 133 mg de FSH usada em todos os grupos foi eficiente em promover o crescimento folicular múltiplo. Quando observado a diferença entre os folículos presentes nas duas US, o G12hP4GnRH tem uma relação mais próxima ao número de CL, o que nos sugere que a maior parte das ovulações ocorreram entre a última dose de FSH e 12 h após a inseminação. A alta taxa de fertilização das estruturas recuperadas no G12hP4GnRH também reforça essa hipótese, sugerindo que o tempo entre a primeira e a última ovulação tenha ocorrido de forma mais sincronizada, assim, ao se utilizar sêmen congelado, este grupo favoreceu a condição de viabilidade mais curta dos espermatozoides, gerando maior taxa de fertilização. Segundo Walker et al. (1986) a administração de GnRH ao final da superestimulação com FSH reduz o tempo entre a primeira e a última ovulação e o tempo de início das ovulações. Em outro estudo o GnRH levou a ovulação de 44-46% das ovelhas em 24h e em todos animais em 34h (Quirke et al., 1979), indicando o efeito benéfico no uso do GnRH sobre a sincronia da ovulação e conseqüentemente aumentando a taxa de fertilização.

Alguns fatores são apontados como responsáveis por baixa taxa de recuperação embrionária após um tratamento superovulatório como: a presença de grandes folículos anovulatórios, que elevam a concentração de estradiol (Jabbour & Evans, 1991), afetando o ambiente uterino e, portanto, interferindo na captação dos oócitos pelas fímbrias ou no transporte dos mesmos (Murray et al., 1994); a alta taxa de ovulação prejudica a captação oocitária (Armstrong & Evans, 1983; Thompson et al., 1995; D'Alessandro et al., 2005; Simonetti, et al., 2008); a manipulação física da ovelha e do útero, bem como a taxa de inflação da cavidade abdominal no momento da IA por laparoscopia, também podem interferir negativamente sobre a captação de oócitos pelas fímbrias (Bari et al., 1999); e a RPCL também está associada a baixa recuperação de embriões (Cognie et al., 2003), ou mesmo a nenhuma recuperação (Schiewe et al., 1990). No presente trabalho a taxa de recuperação foi maior no G12hP4 (60%) do que no controle (40%) e G12hP4GnRH (37%).

No primeiro caso ela pode ser considerada moderada e se assemelha com os 52-59% obtidos por Oliveira et al. (2012) e inferior a excelente taxa de recuperação (80%) relatada por Cordeiro et al (2003), todos em ovelhas da raça Santa Inês. Das razões para a baixa recuperação geral neste experimento pode-se apontar o alto número de ovulações e o não controle da inflação da cavidade abdominal, apesar do procedimento ter sido realizado pelo mesmo técnico e a cavidade ter sido inflada apenas o suficiente para a visualização do trato reprodutivo.

Apesar de não existir diferença na quantidade de embriões transferíveis e congeláveis, estes foram mais que o dobro no Grupo com maior tempo de exposição a progesterona e aplicação de GnRH (G12P4GnRH) do que no Grupo Controle, possivelmente pela menor degeneração embrionária e maior fertilização dos oócitos no primeiro grupo. Menchaca et al. (2009) verificaram uma maior taxa de fertilização que foi responsável por um aumento no número de embriões viáveis e congeláveis quando o GnRH foi aplicado no fim do período de superestimulação.

Quando o tratamento não é capaz de manter concentrações fisiologicamente normais de progesterona, é possível que haja alterações nos padrões de crescimento folicular e dominância dos grandes folículos estrogênicos (Scaramuzzi et al., 1988; Leyva et al., 1998; Viñoles et al., 1999), bem como alterações no processo de fertilização e no desenvolvimento de um embrião de boa qualidade (Theodosiadou et al., 2004; Gonzalez-Bulnes et al., 2005). O maior tempo de exposição à progesterona, durante a superestimulação ovariana com FSH, no presente estudo foi responsável por uma redução na taxa de embriões degenerados, indicando o efeito benéfico sobre o oócito e/ou embrião.

Durante o fim do tratamento superestimulatório existem folículos grandes em diferentes graus de desenvolvimento. Para o desenvolvimento de um embrião saudável é necessário que o oócito adquira competência, e isto ocorre entre o final do crescimento e início da maturação oocitária, por meio de mudanças estruturais e moleculares (Hytel et al., 1997; Dieleman et al., 2002). O Aumento do período de exposição à progesterona inibe, por um maior tempo, o pico de LH, e isto possivelmente permitiu que os folículos que ainda apresentam oócitos que não atingiram a completa competência venham a desenvolver. Mesmo que isso cause certo grau de atresia nos folículos com oócitos já competentes isto não seria prejudicial, uma vez que um grau médio de atresia folicular não prejudica a capacidade do

oócito (Campbell et al., 1991), podendo a capacidade de desenvolvimento embrionário ser até aumentado com baixo grau de atresia (Blondin & Sirard, 1995).

A melhora na qualidade do oócito e conseqüentemente do embrião associado a uma maior sincronia das ovulações é uma abordagem promissora para aumentar a eficiência dos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões ovino.

## **7 CONCLUSÃO**

O aumento da exposição à progesterona durante o protocolo de superovulação ovina reduziu a proporção de embriões degenerados. A associação do aumento da exposição à progesterona com administração de GnRH é uma alternativa que pode ser adotada em programas de MOTE por aumentar a taxa de fertilização das estruturas coletadas, quando utilizado sêmen congelado nas inseminações artificiais.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMOUN, I.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J.M.; CONTRERAS, I.; GONZALEZ AÑOVER, P.; COCERO, M.J.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ- BULNES, A. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**. v. 66, p. 896-905. 2006.
- ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**. v. 19, p. 31-42. 1983.
- AZAWI, O.I.; AL-MOLA, M.K.M.A. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulationewes. **Tropical Animal Health and Production**. v. 43, p.1351-1355. 2011.
- BARI, F.Y.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MERRELL, B.; MURRAY, A.; RICHARDS, R.I.W. An evaluation of the success of MOET in two breeds of hill sheep maintained under normal systems of hill flock management. **Animal Science**. v. 69, p. 367-376. 1999.
- BARIL, G.; POUGNARD, J.L.; FREITAS, V.J.F.; LEBOEUF, B.; SAUMANDE, J. A new method for controlling the precise time of occurrence of the Preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. **Theriogenology**. v. 45, p. 697-706, 1996.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v. 41, p. 54-62. 1995.
- CAMPBELL, B.K.; PICTON, H.M.; MANN, G.E.; MCNEILLY, A.S.; BAIRD, D.T. Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. **J. Journal of Reproduction and Fertility**. v. 93, p. 81-96. 1991
- COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**. v. 59, p. 171-188. 2003.



- COGNIE, Y.; BARIL, G. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **INRA Productions Animales**. v. 15, p. 199-207. 2002.
- COGNIE, Y. State of art in sheep and goat embryo transfer. **Theriogenology**. v. 51, p. 105-116. 1999.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 2<sup>a</sup> ed., Belo Horizonte, 1998.
- CORDEIRO, M.F.; LIMA VERDE, J.B.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; FARIAS, L.N.; SALLES, H.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**. v. 49, p. 19-23. 2003.
- D'ALESSANDRO, A., MARTEMUCCI, G., TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**. v. 63, p. 1764-1774. 2005.
- D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; TOTEDA, F.; GAMBACORTA, M.; MANCHISI, A. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. **Small Ruminant Research**. v. 19, p. 255-261. 1996.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJIN, H.M.; WRENZYCHI, C.; KRUIP, T.A.M.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**. v. 57, 5-20. 2002.
- GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M.A. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**. v. 63, p. 2523-2534. 2005.
- GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J.; DOMÍNGUEZ, V.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on response to superovulatory FSH treatment in ewes. **Theriogenology**. v. 60, p. 281-288. 2003.
- GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SOUZA, C.J.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J.; BAIRD, D.T. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 37, p. 357-361. 2002b.
- GONZALEZ-BULNES, A., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M.J., LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in spanish merino ewes. **Theriogenology**. v. 54, p.1055-1064. 2000.
- HIEMSTRA, S.J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS H., The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Eds). **The role of biotechnology in exploring and protecting**

**agricultural genetic resources.** FAO: Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/a0399e/a0399e00.htm>>. Acesso em: 29/01/2013.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v. 47, 23-32. 1997.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. [2011]. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P>> Acesso em: 17/01/2013.

JABBOUR, H.N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. **Animal Reproduction Science**. v. 24, p. 259-270. 1991.

JABBOUR, H.N.; RYAN J.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 3, p. 699-707. 1996.

KAKAR, M.A.; MADDOCKS, S.; LORIMER, M.F.; KLEEMANN, D.O.; RUDIGER, S.R.; HARTWICH, K.M.; WALKER, S.K. The effect of periconception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. **Theriogenology**. v. 64, p. 1090-1103. 2005.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**. v. 50, p. 395-416. 1998.

LOPES JÚNIOR, E.S.; MAIA E.L.M.M.; PAULA, N.R.O.; TEIXEIR, D.I.A.; VILLARROEL; A.B.S.; RONDINA D.; FREITAS, V.J.F. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 38, p. 555-561. 2006.

MAXWELL, W.M.C.; BUTLER, L.G. Intra-uterine insemination of ewes with frozen semen. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**. v. 102, p. 233-234. 1984.

MENCHACA, A.; VILARINÕ, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**. v. 72, p. 477-483. 2009.

MURRAY, J.F.; DOWNING, J.A.; SCARAMUZZI, R.J.; EVANS, G. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. **Theriogenology**. v. 42, p. 1337-1347. 1994.

NASSER, L.F.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; REZENDE, C.R.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. v. 76, p. 320-327. 2011.

OLIVEIRA, M.E.F.; CORDEIRO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SOUZA, S.F.; PIERONI, J.S.P.; RODRIGUES, L.F.S.; FONSECA, J.F.; VICENTE, W.R.R. Does supplemental LH changes

- rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? **Ciência Rural**. v. 42, n. 6, p. 1077-1082. 2012.
- SILVA, B.D.M.; SARTORI, R.; SILVA, T.A.S.N.; CARDOZO, D.M.M.; OLIVEIRA, M.A.L.O.; NEVES, J.P. Sincronização de estro com prostaglandina f2 $\alpha$  versus progestágeno associado à gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ovelhas Santa Inês no Distrito Federal, Brasil. **Ciências Animais**. v. 11, n. 2, p. 417-424. 2010.
- QUIRKE, J.R., JENNINGS, J.J., HANRAHAN, J.P.; GOSLING, J.P. Oestrus, time of ovulation, ovulation rate and conception rate in progestagen-treated ewes given Gn-RH, Gn-RH analogues and gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 56, p. 479-188. 1979.
- ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certification and identification of embryos. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds) **Guide of International Embryo Transfer Society**. 1999. p.109-122.
- RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S.; CARBAJAL, B.; BENQUET, N.; PINCZAK, A. Superovulatory response to FSH treatments after different progesterone primings in ewes. **Small Ruminant Research**. v. 33, p. 159-164, 1999.
- SALEHI, R.; KOHRAM, H.; TOWHIDI, A.; KERMANI MOAKHAR, H. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. **Small Ruminant Research**. v. 93, p. 213-217. 2010.
- SCARAMUZZI, R.J.; DOWNING, J.A.; CAMPBELL, B.K.; COGNIE, Y. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. **Australian Journal of Biological Sciences**. v. 41, p. 37-45. 1988.
- SCHIEWE, M.C.; FITZ, T.A.; BROWN, J.L.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin-F2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 93, p. 19-30. 1991.
- SCHIEWE, M.C.; HOWARD, J.G.; GOODROWE, K.L.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2alpha synchronization is compromised by premature luteal regression. **Theriogenology**. v. 34, p. 469-486. 1990.
- SCUDAMORE, C.L.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; ROBERTSON, I.S. The effect of method of oestrous synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. **Animal Reproduction Science**. v. 34, p. 127-133, 1993.
- SHARMA, V.K.; GUPTA R.C.; KHAR, S.K.; KHURANA N.K. Plasma progesterona profiles, ovarian response and embryo recovery incrossbred ewes superovulated during breeding and non-breeding seasons. **Animal Reproduction Science**. v. 34, p. 119-126. 1993.
- SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O.E.; CAROU, N.; ALBERIO, R.H.; ABECIA, J.A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**. v. 104, p. 227-237. 2008.

- THEODOSIADOU, E.; GOULAS, P.; KOUSKOURA, T.H.; SMOKOVITIS, A. Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. **Animal Reproduction Science**. v. 80, p. 59-67. 2004.
- THOMPSON, J.G.; BELL, A.C.S.; MCMILLAN, W.H.; PETERSON, A.J.; TERVIT, H.R. Donor and recipient ewe factors affecting in vitro development and post- transfer survival of cultured sheep embryos. **Animal Reproduction Science**. v. 40, p. 269-279. 1995.
- VEIGA-LOPEZ, A.; DOMINGUEZ, V.; SOUZA, C.J.H.; GARCIA-GARCIA, R.M.; ARIZNAVARRETA, CARMEN.; TRESGUERRES, J.A.F.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Features of follicle-stimulating hormone stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles, **Fertility and Sterility**. v. 89, p. 1328-1337, 2008.
- VIÑOLES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**. v. 51, p. 1351-1361. 1999.
- WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; SEAMARK, R.F. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 77, p. 135-142. 1986.
- WALTER, B.M.T.; SAMPAIO, A.B.A. **Vegetação da fazenda sucupira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 110p.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A Santa Inês é a raça de maior expressão na ovinocultura brasileira, devido a sua capacidade de adaptação a diferentes regiões, porte e potencial produtivo. Desta forma, o melhoramento genético desses animais é de grande importância, nesse sentido, os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões são fundamentais para a multiplicação de indivíduos selecionados com redução no intervalo entre gerações.

Devido à variação na resposta superovulatória provocada por fatores genéticos, torna-se importante estabelecer um método de superovulação específico para cada raça, capaz de fazer com que os animais expressem o máximo do seu potencial, principalmente pensando em raças localmente adaptadas ou ameaçadas de extinção.

O aumento da exposição à progesterona associado a uso de agonista de GnRH é uma alternativa promissora para aumentar a quantidade de embriões transferíveis nos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões ovino.