



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA SUPEROVULAÇÃO OVINA

DÊMIS CARLOS RIBEIRO MENEZES

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2014**



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

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA SUPEROVULAÇÃO OVINA

DÊMIS CARLOS RIBEIRO MENEZES

ORIENTADOR: PROF. DR. JAIRO PEREIRA NEVES

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. IVO PIVATO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2014**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MENEZES, D. C. R. **Avaliação de protocolos para superovulação ovina**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 85p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas desde que citadas às fontes.

FICHA CATALOGRÁFICA

MENEZES, D. C. R. **Avaliação de protocolos para superovulação ovina**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 85p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2014.

1. embrião, 2. ovelhas, 3. reprodução, 4. ruminantes, 5. Santa Inês. I. Neves, Jairo Pereira, orientador. II. Pivato, Ivo, co-orientador. III. Título.

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

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA SUPEOVULAÇÃO OVINA

DÊMIS CARLOS RIBEIRO MENEZES

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**JAIRO PEREIRA NEVES, DOUTOR, (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB)
ORIENTADOR**

**RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, DOUTOR, (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UnB).
EXAMINADOR INTERNO**

**ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, DOUTOR, (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA - CENARGEN)
EXAMINADOR INTERNO**

**FABIANA CRISTINA VARAGO, DOUTORA, (UNIVERSIDADE DE ALFENAS -
UNIFENAS)
EXAMINADOR EXTERNO**

**MARÍLIA VIVIANE SNEL DE OLIVEIRA, DOUTORA, (UNIÃO PIONEIRA DE
INTEGRAÇÃO SOCIAL - UPIS)
EXAMINADOR EXTERNO**

BRASÍLIA/DF, 26 de Novembro de 2014.

Aos que tiveram ao meu lado durante essa jornada e que me fizeram ser forte e mesmo diante das dificuldades nunca me dei por vencido, dedico...

A minha esposa Ana Luíza Silva Guimarães e meus filhos Ana Sofia Guimarães Menezes, Mateus Guimarães Menezes e Ana Júlia Guimarães Menezes, que são a razão maior da minha caminhada e por quem tenho amor incondicional.

Aos meus pais, Francisco das Chagas Menezes e Jovelina Maria Ribeiro Menezes, por terem me dado à oportunidade de estudar e sempre acreditarem que o sonho é possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu tenha a oportunidade de escolher o caminho a seguir, junto das pessoas que mais amo;

A minha esposa Ana Luíza e meus filhos Ana Sofia, Mateus e Ana Júlia, por entenderem minha ausência durante a execução das atividades práticas;

A meus pais Francisco e Jovelina, pelo apoio que sempre me deram;

Aos meus familiares, especialmente minha avó Dolores “*in memoriam*”;

A meu sogro Leoni Araújo Guimarães e minha sogra “Odilia” Maria Pereira da Silva, pelo apoio durante esta jornada, serei eternamente grato;

À minha tia Socorrinha, pelo apoio no início de tudo quando morei em Parnaíba;

Aos meus irmãos Ghardell, Loretana, Miquelina e Nalyta, por acreditarem na minha capacidade de superar obstáculos;

Ao amigo Itacir Melara e sua esposa Paulina, por terem aberto sua casa e me ajudado de todas as formas durante meus experimentos;

Ao meu orientador Jairo Pereira Neves, que sem me conhecer, aceitou o desafio de me orientar e teve compreensão durante todo o período de doutorado;

Ao amigo Alexandre Floriani, que me acolheu e acreditou no meu potencial, pois sem ter nenhuma responsabilidade sobre meu trabalho, abriu sua sala para mim e me deu condições para realizar meus experimentos;

Ao meu co-orientador Ivo Pivato, que aceitou o desafio de me ajudar durante esta caminhada;

Ao corintiano Pablo, pelo apoio durante todos os experimentos e pela capacidade de querer aprender sempre;

Aos cruzeirenses Teco e Manoel, pela ajuda nas atividades do projeto;

Aos colegas de pós-graduação Carole, Natália, Oscar e a Dr^a Bianca pela ajuda nas atividades do projeto;

Aos companheiros Eduardo, Gilvan e Maurício pelo apoio durante os experimentos;

Ao Sr. Branco e sua esposa pelo apoio durante minha permanência na fazenda;

À UnB, pela oportunidade de estar cursando um doutorado e apoio financeiro;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, através do Dr. Alexandre pelo apoio financeiro;

Ao CNPq, através do Dr. Jairo e Dr. Alexandre pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram e torceram por mim, meu muito OBRIGADO.

ÍNDICE

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xiii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Problemática e relevância.....	2
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Geral.....	4
1.2.2 Específicos.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Tranferência de embriões.....	5
2.2 Controle hormonal da reprodução.....	6
2.3 Protocolos superovulatórios.....	8
2.4 Fatores que interferem na produção de embriões.....	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO 2 – TRATAMENTO COM PROGESTERONA E REDUÇÃO DA DOSE DE FSH NO PROTOCOLO “DIA 0” PARA PROGRAMAS DE MÚTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM OVELHAS SANTA INÊS.....	22
1 RESUMO.....	23
2 ABSTRACT.....	24
3 INTRODUÇÃO.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Local, manejo alimentar e animais.....	27
4.2 Protocolo de superovulação e exame ultrassonográfico.....	28
4.2.1 Experimento 1: Resposta superovulatória de doadoras Santa Inês frente a diferentes doses de FSH.....	28

4.2.2 Experimento 2: Uso da progesterona durante a superovulação e seu efeito sobre a resposta superovulatória e embrionária de doadoras da raça Santa Inês....	29
4.3 Inseminação artificial.....	31
4.4 Coleta, avaliação embrionária e resposta superovulatória.....	31
4.5 Tratamento pós-cirúrgico.....	33
4.6 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Experimento 1: Resposta superovulatória de doadoras Santa Inês frente a diferentes doses de FSH.....	34
5.2 Experimento 2: Uso da progesterona durante a superovulação e seu efeito sobre a resposta superovulatória e embrionária de doadoras da raça Santa Inês.....	36
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPÍTULO 3 – RESPOSTA NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA EM DOADORAS DA RAÇA SANTA INÊS FRENTE A DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE FSH..	48
1 RESUMO.....	49
2 ABSTRACT.....	50
3 INTRODUÇÃO.....	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 Local, manejo alimentar e animais.....	53
4.2 Protocolo de superovulação e exame ultrassonográfico.....	54
4.3 Inseminação artificial.....	55
4.4 Coleta, avaliação embrionária e resposta superovulatória.....	56
4.5 Tratamento pós-cirúrgico.....	57
4.6 Análise estatística.....	58
5 RESULTADOS	59
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68

RESUMO

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA SUPEROVULAÇÃO OVINA

Dêmis Carlos Ribeiro Menezes¹, Jairo Pereira Neves², Ivo Pivato²

¹Médico Veterinário, UnB, Brasília-DF, Brasil, ²Professor Doutor, UnB, Brasília-DF, Brasil.

Realizaram-se três experimentos com objetivo de avaliar os efeitos da utilização de doses reduzidas e diminuição do número de administrações de FSH, além da utilização exógena de progesterona na resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas. Nos experimentos 1 e 2 fez-se uma pré-sincronização do estro e 84 h após iniciou-se a estimulação ovariana utilizando FSH em 8 aplicações. No experimento 1 os tratamentos diferiram quanto a dose de FSH, sendo T1: 200 mg, T2: 133 mg e T3: 80 mg. Para o experimento 2 no T1 sem P4 e no T2 com P4 inserido 12h antes do início da SOV. No experimento 3 para o protocolo de SOV a sincronização do estro foi obtida com CIDR por 14 dias. Para a estimulação ovariana utilizou-se 133mg de FSH, no T1 em 8 aplicações a cada 12 horas e no T2 em 4 aplicações a cada 24 horas. As IA foram realizadas com sêmen congelado por via laparoscópica e a coleta de embriões por hemilaparoscopia. No experimento 1 o percentual de doadoras que responderam a SOV foi menor ($p < 0,01$) quando utilizada a dose de 80 mg de FSH do que quando utilizadas as doses de 133 e 200 mg, que foram semelhantes entre si. Observou-se que a média de estruturas coletadas (T1 = 3,92; T2 = 4,29; T3 = 2,23), de embriões viáveis (T1 = 1,54; T2 = 3,86; T3 = 0,33), embriões congeláveis (T1 = 1,38; T2 = 3,29; T3 = 0,33) e a média de CL das ovelhas que

responderam a SOV (T1 = 8,46; T2 = 8,14; T3 = 5,67) foram similares entre os tratamentos ($p > 0,05$). No experimento 2 observou-se que a média de estruturas coletadas (T1 = 3,43; T2 = 4,0), de embriões viáveis (T1 = 1,43; T2 = 1,83), embriões congeláveis (T1 = 1,29; T2 = 1,33), a taxa de resposta das doadoras à SOV (T1 = 48,28%; T2 = 41,38%) e a média de CL (T1 = 6,29; T2 = 7,0) foram semelhante ($p > 0,05$). No experimento 3 observou-se que a média de estruturas coletadas (T1 = 3,47; T2 = 2,55) e a taxa de resposta das doadoras à SOV (T1 = 88,24%; T2 = 64,70%) foram similares entre os tratamentos ($p > 0,05$). No que se refere a embriões viáveis (T1 = 2,40; T2 = 0,82), embriões congeláveis (T1 = 2,07; T2 = 0,82) e média de CL (T1 = 7,47; T2 = 5,73) o grupo oito doses foi melhor que o grupo quatro doses ($p < 0,05$). As doses de 200, 133 e 80 mg de FSH para realização da SOV em ovelhas Santa Inês apresentaram resultados semelhantes na produção de embriões, sendo 80 mg pior na resposta superovulatória. A utilização de progesterona exógena durante a SOV não melhora a resposta superovulatória e produção de embriões. O protocolo oito doses de FSH a intervalos de 12 horas se mostra como a melhor opção para SOV em ovelhas Santa Inês.

Palavras-chave: embrião, ovelhas, reprodução, ruminantes, Santa Inês.

ABSTRACT

PROTOCOLS FOR SHEEP SUPEROVULATION ASSESSMENT

Dêmis Carlos Ribeiro Menezes¹, Jairo Pereira Neves², Ivo Pivato²

¹Veterinarian, UnB, Brasília-DF, Brazil, ² Professor Doctor, UnB, Brasília-DF, Brazil.

There were three experiments to evaluate the effects of using low doses and reducing the number of FSH administration, in addition to the exogenous use of progesterone in superovulatory response and embryo production in sheep. In Experiments 1 and 2 was made a pre-synchronization of estrus and 84 h after started ovarian stimulation using FSH in 8 applications. In experiment 1 the treatments differ in the FSH dose: T1: 200 mg, T2: T3 133 mg and 80 mg. For experiment no 2 at T1 and T2 P4 P4 inserted 12h before the SOV. Experiment 3 SOV protocol for synchronization of oestrus was obtained with CIDR for 14 days. For ovarian stimulation is used 133mg of FSH in 8 T1 applications every 12 hours in 4 and T2 applications every 24 hours. The inseminations were performed with frozen semen by laparoscopy and embryo collection by hemilaparoscopia. In experiment 1 the percentage of donors who responded to SOV was lower ($p < 0.01$) when used at a dose of 80 mg of FSH when used at doses of 133 and 200 mg were similar. It was observed that the mean collected structures (T1 = 3.92, T2 = 4.29, T3 = 2.23), of viable embryos (T1 = 1.54, T2 = 3.86, T3 = 0.33), freezable embryos (T1 = 1.38; T2 = 3.29; T3 = 0.33) and the average CL of the sheep who responded to SOV (T1 = 8.46; T2 = 8.14; T3 = 5.67) were similar between treatments ($p > 0.05$). In Experiment 2, we observed that the mean collected structures (T1 = 3.43, T2 = 4.0), viable embryos (T1 = 1.43, T2 = 1.83),

freezable embryo (T1 = 1.29; T2 = 1.33), the donor response rate to the SOV (T1 = 48.28%; T2 = 41.38%) and CL medium (T1 = 6.29, T2 = 7.0) were similar ($p > 0.05$). Experiment 3 showed that the average collected structures (T1 = 3.47; T2 = 2.55) and the response rate of donors to SOV (T1 = 88.24%; T2 = 64.70%) were among treatments ($p > 0.05$). With regard to viable embryos (T1 = 2.40, T2 = 0.82), freezable embryo (T1 = 2.07, T2 = 0.82) and mean CL (T1 = 7.47, T2 = 5.73) the eight-dose group was better than the four-dose group ($p < 0.05$). Doses of 200, 133 and 80 mg of FSH to perform the SOV in Santa Ines ewes showed similar results in the production of embryos, 80 mg worst in superovulatory response. The use of exogenous progesterone during SOV does not improve superovulatory response and embryo production. The protocol eight FSH doses to 12 hours intervals shown as the best option for SOV in Santa Ines sheep.

Keywords: embryo, sheep, breeding, ruminants, Santa Ines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Delineamento experimental. Dia 0 (D0): inserção de esponja com 60 mg de P₄. Dia 6 (D6): remoção da P₄ e aplicação do D-Cloprostenol Sódico (37,5 µg, IM) e eCG (300 UI, IM). Dia 7 (D7): aplicação de GnRH (18 µg de buserelina). Superovulação com FSH realizada duas vezes ao dia entre os dias 9 e 13 (Grupo 200 mg, Grupo 133mg e Grupo 80 mg). Dias 12 e 13 (D12 e D13): aplicação de duas meias doses de D-Cloprostenol Sódico (18,75 µg, IM). Dia 13 (D13): aplicação de GnRH (18 µg de buserelina). Dia 14 (D14): duas IA com intervalos de 10 h. Dia 19 (D19): coleta de embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados uma vez ao dia na primeira e oitava aplicação de FSH.....29

Figura 2.2 Delineamento experimental. Dia 0 (D0): inserção de esponja com 60 mg de P₄. Dia 6 (D6): remoção da P₄ e aplicação do D-Cloprostenol Sódico (37,5 µg, IM) e eCG (300 UI, IM). Dia 7 (D7): aplicação de GnRH (18µg de buserelina). Superovulação com 133 mg de FSH realizada duas vezes ao dia entre os dias 9 e 13 (Grupo sem P₄). Dia 9 (D9): inserção vaginal de CIDR com 0,3 g de P₄ (Grupo com P₄). Dias 12 e 13 (D12 e D13): aplicação de duas meias doses de D-Cloprostenol Sódico (18,75 µg, IM). Dia 13 (D13): aplicação de GnRH (18µg de buserelina). Dia 14 (D14): duas IA com intervalos de 10 h. Dia 19 (D19): coleta de embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados uma vez ao dia na primeira e oitava aplicação de FSH.....30

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Delineamento experimental. Dia 0 (D0): inserção do CIDR com 0,3 g de P₄. Dia 7 (D7): troca do CIDR e aplicação do D-Cloprostenol Sódico (37,5 µg, IM). Dia 14 (D14): remoção do CIDR. Superovulação com 133 mg de FSH realizada duas vezes ao dia entre os dias 12 e 15 (Grupo oito doses) e uma vez ao dia entre os dias 12 e 15 (Grupo quatro doses). Dia 15 (D15): aplicação de GnRH (25 µg de licerelina). Dia 16 (D16): duas IA com intervalos de 10h. Dia 21 (D21): coleta de embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados no dia da aplicação de GnRH.....55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 2.1 Efeito da dose de FSH sobre a resposta superovulatória das doadoras Santa Inês em relação à porcentagem de fêmeas que apresentaram número de CL ≥ 3 e a regressão precoce de corpo lúteo, nos três grupos experimentais (porcentagem).....34
- Tabela 2.2 Efeito da dose de FSH sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês em relação a folículos totais no início da SOV, folículos ≥ 4 mm final da SOV, folículos ≥ 4 mm visualizados na coleta e corpos lúteos, nos três grupos experimentais (média e desvio padrão).....35
- Tabela 2.3 Efeito da dose de FSH sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês em relação ao número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação, nos três grupos experimentais (média e desvio padrão).....35
- Tabela 2.4 Efeito da P₄ durante a SOV sobre a resposta superovulatória das doadoras Santa Inês em relação à porcentagem de fêmeas que apresentaram número de CL ≥ 3 e a regressão precoce de corpo lúteo, nos dois grupos experimentais (porcentagem).....36
- Tabela 2.5 Efeito da P₄ durante a SOV sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês em relação a folículos totais no início da SOV, folículos ≥ 4 mm final da SOV, folículos ≥ 4 mm visualizados na coleta e corpos lúteos, nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão)..36
- Tabela 2.6 Efeito da P₄ durante a SOV sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês em relação ao número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação, nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).....37

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Efeito de diferentes esquemas de aplicação de FSH sobre a resposta superovulatória das doadoras Santa Inês em relação à porcentagem de fêmeas que apresentaram número de CL \geq 3 e a regressão precoce de corpo lúteo, nos dois grupos experimentais (porcentagem).....59

Tabela 3.2 Efeito de diferentes esquemas de aplicação de FSH sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês em relação a folículos \geq 4 mm final da SOV, folículos \geq 4 mm visualizados na coleta e corpos lúteos, nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).....60

Tabela 3.3 Efeito de diferentes esquemas de aplicação de FSH sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês em relação ao número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação, nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).....60

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

%: porcentagem

µg: micrograma

CIDR: dispositivo intravaginal com progesterona

CL: corpo lúteo

E₂ - 17β: estradiol-17β

eCG: gonadotrofina coriônica equina

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FIV: fertilização *in vitro*

FSH: hormônio folículo estimulante

FSH-p: hormônio folículo estimulante purificado suíno

FSH-o: hormônio folículo estimulante purificado ovino

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: gonadotrofina coriônica humana

IA: inseminação artificial

IATF: inseminação artificial em tempo fixo

IM: intramuscular

LH: hormônio luteinizante

MAP: medroxiprogesterona

mg: miligrama

MHz: megahertz

mm: milímetro

MOTE: múltipla ovulação e transferência de embriões

P₄: progesterona

PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}

RPCL: regressão prematura de corpo lúteo

SC: subcutânea

SOV: superovulação

TE: transferência de embriões

UI: unidades internacionais

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problemática e relevância

No Brasil, a ovinocultura vem se destacando como alternativa de produção e rentabilidade para pequenos, médios e grandes produtores (Pacheco & Quirino, 2010). A abertura do mercado para a ovinocultura estimulou a intensificação dessa atividade no Nordeste e região central do país, criando, assim, uma demanda de novas técnicas de manejo (Ribeiro *et al.* 2011). Nesta perspectiva, há necessidade de se conhecer o material genético e o potencial produtivo e reprodutivo dos animais produzidos. Ao desempenho reprodutivo deve-se dar atenção especial, principalmente, devido às particularidades apresentadas pela espécie e por este expressar a eficiência da multiplicação dos genótipos e, conseqüentemente, a lucratividade do sistema produtivo. Para isso é necessário usar todas as ferramentas que auxiliem a reprodução animal (Pacheco & Quirino, 2010). Assim as biotécnicas da reprodução, quando devidamente usadas, são fortes aliadas e respondem por significativas melhorias na produtividade e rentabilidade dos rebanhos (Simplício *et al.* 2007).

O desenvolvimento e aprimoramento dessas biotécnicas, principalmente a MOTE, permitiu o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Isso porque permitiu um maior número de crias por fêmea, o que levou a uma maior disseminação de material genético com características desejáveis (Lima & Santos, 2010), acelerando o processo de seleção animal (Neves *et al.* 2010).

A transferência de embriões em ovinos tem sido intensificada no Brasil especificamente em animais da raça Santa Inês, impulsionadas pela alta valorização de seus produtos e pela necessidade de uma rápida multiplicação do material genético (Fischer Neto, 2009).

Independentemente da biotécnica empregada para melhorar a eficiência reprodutiva, a variação individual na resposta hormonal para múltipla ovulação é condicionada por fatores extrínsecos (pureza, fonte de gonadotrofinas, protocolo de administração e condições ambientais), bem como aos intrínsecos (raça, nutrição, idade e estado reprodutivo), segundo Sartori & Mollo (2007). Avanços na compreensão das funções e inter-relações da foliculogênese, crescimento do folículo, maturação do ovócito, ovulação e fertilização, poderão determinar redução de custos e uma maior eficiência nos tratamentos hormonais nesses programas (Gibbons *et al.* 2011).

O princípio básico da superovulação é o fornecimento de quantidade elevada de alguns hormônios, em determinados momentos, promovendo a ovulações múltiplas. Os principais hormônios utilizados para este fim, são FSH e eCG. O FSH apresenta meia vida curta devendo para isso ser usado com elevada frequência. O eCG, no entanto, devido a problemas relacionados à regressão prematura de corpo lúteo (RPCL) e formação de anticorpos, vem sendo cada vez menos utilizado (Amiridis & Cseh, 2012).

Para Gusmão & Moura (2005) não existe um protocolo para superovulação de ovelhas capaz de oferecer uma segurança mínima na resposta superovulatória. De acordo com Simplício *et al.* (2007), deve-se estar com a expectativa para que 20 a 30% das fêmeas superovuladas não produzam embriões transferíveis. Assim, a busca de maior eficiência no processo em se obter múltiplas ovulações para uma melhor produção embrionária, se faz necessária devido a grande diversidade de resultados das doadoras submetidas a programas de MOTE (Bicudo *et al.* 2009).

Neste sentido Fonseca (2005) relata que a superovulação é um tópico que demanda estudos mais aprofundados para determinação de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes e menos onerosos. A realização de programas de MOTE com menores quantidades de hormônios poderão ser utilizadas com o intuito de verificar a eficiência e variabilidade na resposta embrionária.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta superovulatória, produção e qualidade de embriões em ovelhas da raça Santa Inês frente a utilização dos protocolos de superovulação denominados “Dia 0” e tradicional.

1.2.2 Objetivos específicos

Verificar a resposta superovulatória e produção de embriões, utilizando doses reduzidas de FSH para SOV no protocolo “Dia 0”;

Avaliar a resposta superovulatória e produção de embriões, utilizando progestágenos, durante a SOV no protocolo “Dia 0”;

Determinar a resposta superovulatória e produção de embriões, utilizando diferentes esquemas de aplicação de FSH no protocolo tradicional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transferência de embriões

A programação das atividades reprodutivas do rebanho tem um impacto direto sobre a gestão da criação. Neste contexto através de procedimentos de controle hormonal pode-se realizar a IA e a TE em momentos pré-determinados facilitando o manejo das propriedades (Fonseca, 2006). Essas biotécnicas da reprodução em pequenos ruminantes têm sido cada vez mais utilizadas com o passar dos anos (Fonseca *et al.* 2011).

A TE é a segunda geração das biotécnicas reprodutivas que surgiram e consiste em superestimular os ovários das fêmeas doadoras através de várias doses hormonais para provocar o maior número possível de ovulações simultaneamente e em consequência o máximo de embriões viáveis (Ficher Neto, 2009). Mesmo acessível aos produtores, essa biotécnica tem sido utilizada à multiplicação de animais de alto valor, como forma de melhoramento genético do rebanho e uso comercial, devido ao alto custo e variabilidade dos resultados que proporciona (Amiridis & Cseh, 2012), ainda sim é um procedimento que pode maximizar o número de crias por doadoras (Bicudo *et al.* 2009).

Protocolos eficazes e consistentes de superovulação de animais doadores (Cognie, 1999; Holtz, 2005) e a necessidade de estudos relacionados aos aspectos que interferem nos resultados obtidos na TE (Guerra *et al.* 2011) devem ser analisados pois é importante considerar todos os fatores de variação que podem afetar o resultado final (Rizzo *et al.* 2012). Além disso, os técnicos devem estar cientes das peculiaridades deste processo a fim de se alcançar benefícios com seu uso (Gomes *et al.* 2014).

De acordo com Simplício *et al.* (2007), são recuperados em média cinco embriões viáveis por doadora. Deve-se esperar que 20 a 30% das fêmeas superovuladas em um programa não proporcionem embriões transferíveis. Já Rizzo *et al.* (2009) obtiveram uma média de 8,2 embriões transferíveis por doadora. Gusmão *et al.* (2007) realizaram coleta de embriões em ovelhas Santa Inês e conseguiram uma média de 3,4 embriões viáveis, em ovelhas Dorper, encontraram valores médios de 3,5 para embriões viáveis (Gusmão *et al.* 2009).

2.2 Controle hormonal da reprodução

A reprodução dos pequenos ruminantes pode ser controlada por vários métodos que envolvem a administração de hormônios exógenos para modificar a cadeia fisiológica de acontecimentos envolvidos no ciclo sexual, relacionada com o número de folículos presentes nos ovários no início do tratamento com a gonadotrofina e da sua capacidade de crescer até estágios pré-ovulatórios (Gonzales-Bulnes *et al.* 2000). O FSH é crucial para a manutenção da função ovariana e necessário para o crescimento folicular, a concentração deste pode ser considerada um fator limitante para a maturação folicular (Saraiva *et al.* 2008).

A ativação dos folículos primordiais do estágio de quiescência para a fase de crescimento é a primeira e essencial etapa em que os folículos primordiais deixam o estágio de repouso e iniciam seu crescimento. Em espécies mamíferas, o contínuo crescimento folicular é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como por fatores de crescimento que agem, estes últimos, direta ou indiretamente, de forma autócrina ou parácrina (Martins *et al.* 2008).

O ciclo estral das ovelhas dura em média 17 dias, sendo que neste período ocorre a emergência de três ou quatro ondas de crescimento folicular em intervalos que variam de três a sete dias e em cada onda, um, dois ou três folículos podem atingir tamanho maior que 5 mm (Contreras-Solis *et al.* 2008; Menchaca *et al.* 2010) com capacidade ovulatória (Bartlewski *et al.* 2011). Seu controle ainda apresenta variações devido ao pouco conhecimento dos mecanismos que envolvem o crescimento folicular e momento ovulatório. O entendimento desses mecanismos

é imprescindível quando é levado em consideração a utilização das biotécnicas de sincronização, indução de estro e superovulação (Bicudo *et al.* 2009).

Menchaca *et al.* (2010) relatam que os grandes folículos inibem o crescimento dos folículos restantes através da supressão de FSH, pela ação da inibina A e do estradiol, ocasionando uma dominância folicular. Recomendam, dessa forma, iniciar um protocolo de superovulação na ausência desses grandes folículos, logo após a ovulação, quando o grupo de pequenos folículos estiver crescendo de forma homogênea.

Toosi *et al.* (2010) questionam a existência da dominância folicular em ovelhas, considerando que os mecanismos para a seleção do folículo, para o crescimento e desenvolvimento em ondas foliculares e para reposição do grupo de pequenos folículos ovarianos não são claros. Esta hipótese também foi defendida por Bartlewski *et al.* (2011) por suspeitarem que os folículos de duas ondas consecutivas podem ovular simultaneamente, especialmente em ovelhas prolíficas e ondas foliculares induzidas não suprimem ou retardam o pico de FSH e subsequente crescimento do folículo.

O uso de dispositivos de progestágenos em combinação com prostaglandinas resultam numa boa resposta de estro (Fleisch *et al.* 2012) podendo ser usados em combinação com o eCG, FSH e hCG nos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) (Abecia *et al.* 2012). Quando utilizar-se o eCG na sincronização do cio e ovulação, deve-se observar o momento da manifestação do estro, pois pode haver uma antecipação deste evento (Ali, 2007). No entanto, devido a problemas relacionados a RPCL e formação de anticorpos, o eCG vem sendo substituído pelo FSH nos protocolos de SOV. Mesmo assim o FSH apresenta uma meia vida curta dificultando seu uso na SOV, devendo para isso ser usado com pequenos intervalos de aplicação (Amiridis & Cseh, 2012). Apesar das controvérsias, Murphy (2012) cita a utilidade do eCG na indução da foliculogênese, promoção da puberdade, reversão do anestro e indução da SOV para TE.

Evans *et al.* (2001) relatam que em um protocolo de sincronização com progestágenos por 14 dias, algumas ovelhas podem ovular ovócitos envelhecidos, incapazes de serem fertilizados e de se transformarem em embriões viáveis. Além disso, Berlinguer *et al.* (2007) evidenciaram que os folículos ovulatórios de ovelhas tratadas com progestágenos mostram deficiências na secreção de E₂ durante a fase pré-ovulatória. Baby & Bartlewski (2011)

encontraram evidências que a P₄ atua como regulador da concentração sérica de FSH em ovelhas, o que pode até determinar o número de folículos antrais por ciclo estral.

A hipótese de que a indução da luteólise durante o ciclo estral natural possa ser usada como método de sincronização do estro em técnicas de reprodução assistida em ovinos (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2005) é reforçada por Fierro *et al.* (2011), já que baixas concentrações de P₄ resultam em folículos pré-ovulatórios com taxa de crescimento mais rápida e maior diâmetro, acarretando menores taxas de ovulação, concepção, prolificidade e fecundidade (Fierro *et al.* 2013). A P₄ pode agir diretamente no ovário na melhoria do crescimento e desenvolvimento folicular, impedindo o desenvolvimento de grande folículo persistente, como também pode agir sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Husein & Ababneh, 2008).

Karaca *et al.* (2009) relataram que a combinação de análogo de GnRH (buserelina) com P₄ para protocolo de sincronização de estro, melhorou a taxa de fertilidade em ovelhas Tahirova na Turquia. Já Cavalcanti *et al.* (2012) também realizaram a sincronização de estro utilizando P₄ em combinação com análogo de GnRH (Licerelina), mas não encontraram melhora na taxa de prenhez em ovelhas mestiças Santa Inês/Dorper.

Para Barret *et al.* (2008) e Menchaca *et al.* (2007) ovelhas tratadas com E₂-17 β, MAP e eCG apresentaram sincronia no momento da emergência da onda folicular e da ovulação. Bartlewski *et al.* (2008) observaram que a SOV realizada após a administração de E₂-17 β resultou em aumento no número de ovulação de folículos antrais e reduziu significativamente o número de folículos anovulatórios luteinizados, melhorando os resultados de programas de IATF e TE.

2.3 Protocolos superovulatórios

A superovulação é um processo que demanda estudos mais aprofundados para determinação de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes e menos onerosos. Estudos detalhados que caracterizem doses menores e mais eficientes de hormônios poderão elevar a eficiência e diminuir a variabilidade de resultados em protocolos de SOV (Fonseca, 2005). Os protocolos tradicionais de SOV em pequenos ruminantes utilizam longos períodos de

progestágenos (12 - 18 dias) e administração de gonadotrofina (FSH ou eCG) para superestimulação ovariana. Estes protocolos não levam em consideração a informação sobre a dinâmica folicular ovariana, já que essa condição tem sido associada à variabilidade na resposta a SOV (Menchaca & Rubianes, 2006).

Para a realização da SOV em programas de transferência de embriões em ovinos, estão disponíveis produtos tais como o Folltropin[®] (FSH-p), o Pluset[®] (FSH-p) e o Ovagen[®] (FSH-o) os quais tem se mostrado potencialmente eficientes na função de estimular o desenvolvimento folicular (Magalhães, 2009).

Gonzales-Bulnes *et al.* (2002) indicam que a administração de doses decrescentes de FSH-o induz o crescimento de um número elevado de folículos pré-ovulatórios responsivos a gonadotrofina, com posterior ovulação em todos os animais em que a onda de LH foi detectada.

A realização da SOV pelo protocolo mais comumente utilizado, FSH em 8 aplicações em doses decrescentes, inserção de dispositivo com P₄ de 12 a 14 dias e eCG no momento da remoção de P₄, apresentou resultado variável no número e qualidade dos embriões coletados. Mas quando se utilizou o GnRH como indutor da ovulação 24 h após remoção de P₄, houve um aumento na produção embrionária, em número e qualidade. Estes resultados são importantes para ajudar na implementação de programas de reprodução assistida em pequenos ruminantes (Menchaca *et al.* 2009).

A redução na concentração plasmática de P₄ ocasiona um *feedback* positivo entre o E₂, produzido pelo folículo dominante em crescimento, e o GnRH culminando em um pico pré-ovulatório de LH e na ovulação do folículo. As concentrações subluteais de P₄ aumentam a frequência dos pulsos, mas não o pico de LH, ocasionando a persistência do folículo dominante. Já o aumento na concentração de P₄ causa um efeito positivo na renovação folicular, aumentando o número de grandes folículos com potencial ovulatório (Rubianes & Menchaca, 2006).

Novas abordagens para controlar a dinâmica folicular e para sincronizar a emergência da onda 1 (protocolo “Dia 0”), tem sido eficazes quando aplicadas antes de se iniciar a SOV. Em geral, esta sincronização pode evitar a dominância folicular, aumentando o seu recrutamento, as taxas de ovulação, a resposta superovulatória das fêmeas e/ ou produção de embriões (Menchaca *et al.* 2010). Neste protocolo considera-se que um grupo homogêneo de pequenos folículos em crescimento, sem que haja folículo dominante, respondam a estimulação

com FSH desencadeando um processo adequado de ovulações múltiplas (Rubianes & Menchaca, 2006).

Menchaca *et al.* (2007) utilizando o protocolo “Dia 0” obtiveram cerca de três CL e dois embriões de graus 1 e 2 adicionais quando comparado com o protocolo tradicional em cabras. Arashiro *et al.* (2009) e Neves *et al.* (2010) não encontraram diferenças entre o protocolo tradicional e protocolo “Dia 0” em relação ao número de CL, ovócitos, embriões viáveis e resposta superovulatória.

Uma percentagem inferior de embriões viáveis foi obtida em ovelhas submetidas a oito doses de FSH e uma diminuição na proporção FSH/LH, em comparação com os tratamentos com apenas quatro doses de FSH e uma proporção de FSH/LH constantes (D’alessandro *et al.* 2005). Menchaca *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2012) observaram uma clara melhoria na produção de embriões transferíveis utilizando um indutor da ovulação 24 h após a remoção do CIDR em protocolo de SOV com oito doses decrescente de 240 a 256 mg de FSH.

Forcada *et al.* (2011) demonstraram a eficácia da utilização de um protocolo com uma única dose de 210 UI de FSH e 500 UI de eCG para SOV e produção de embriões, em comparação com o protocolo de administração de seis doses decrescentes de 280 UI de FSH em ovelhas da raça Ojalada. Assim como Simonetti *et al.* (2008) que demonstraram a eficácia dos protocolos simplificados para induzir superovulação em ovelhas da raça Corriedale. Entre os protocolos utilizados, os de FSH-o junto com eCG numa única dose produziu resultado semelhante à do protocolo de doses múltiplas de FSH.

Os resultados do trabalho de Wu *et al.* (2011) indicam que uma dose total de 120 mg de FSH em uma aplicação diária por três dias consecutivos pode ser tão eficaz quanto 150 mg em duas aplicações diárias por três dias consecutivos na SOV de ovinos da raça Xinji, pois não houve diferença no número de embriões recuperados e de embriões transferíveis entre os grupos. Cueto *et al.* (2011) concluíram que o protocolo tradicional se mostrou mais vantajoso para ovelhas da raça Merino na Patagônia quando comparado com um protocolo em única dose, tanto na resposta quanto na produção embrionária.

A variabilidade na resposta superovulatória e produção de embriões após a SOV dependem da dose, fonte de hormônio, frequência de administração e a fase do ciclo estral (Grazul-Bilska *et al.* 2007). Utilizando o protocolo tradicional de SOV com 200 mg de FSH administrado em oito doses foi possível obter uma média variando entre 3,8 e 7,33 embriões em

ovelhas de diversas raças e a SOV sendo realizada inclusive no período do anestro sazonal (Azawi *et al.* 2010; Bartlewski *et al.* 2009; Bettencourt *et al.* 2008; Gharbi *et al.* 2012). Bruno-Galarraga *et al.* (2014) recuperaram uma média de 8,3 embriões totais utilizando 80 mg de FSH em oito aplicações para a SOV.

Mayorga *et al.* (2011) realizaram a SOV em ovelhas após a detecção do estro natural e verificaram não haver diferença na resposta e produção embrionária quando comparadas com ovelhas submetidas ao protocolo tradicional.

2.4 Fatores que interferem na produção de embriões

Diversos estudos sobre MOTE estão focados na variabilidade da taxa de ovulação e produção de embriões transferíveis em resposta ao tratamento com FSH exógeno (Cognie *et al.* 2003). Devido ser esse o evento menos previsível, podendo ser o mais frustrante e ainda não solucionado quanto ao problema na variabilidade da resposta superovulatória das doadoras (Fonseca *et al.* 2010). A possibilidade de maximizar as taxas de fertilidade em ovelhas reside em melhorar os processos de crescimento e desenvolvimento folicular (Souza, 2013).

Muitos fatores podem afetar os resultados das respostas superovulatórias em ovelhas, mas algumas medidas podem ser tomadas para minimizar estes resultados, as preparações de FSH são mais apropriadas para a estimulação da SOV (Silva *et al.* 2003). Pode-se também promover a seleção de ovelhas multíparas com idade inferior a três anos e mestiças (Ehling *et al.* 2003), a raça (Ammoun *et al.* 2006) e ovelhas com estro natural para tratamento superovulatório, o que poderia incrementar a eficiência da MOTE, pela possibilidade de recuperação de maior número de embriões transferíveis (Quan *et al.* 2011).

Bari *et al.* (2001) indicam que em coletas subsequentes as doadoras apresentam respostas variadas podendo evidenciar que esta pode estar relacionada aos efeitos não repetíveis. Assim, Bruno-Galarraga *et al.* (2014) relatam que a elevada repetibilidade da resposta ovariana a sucessivos tratamentos superovulatórios teria de estar associada com um elevado nível de reprodutibilidade para o número de embriões viáveis recuperados para ser utilizado como um critério para a seleção de doadoras com base na sua resposta ao primeiro tratamento hormonal.

Forcada *et al.* (2000) não encontraram diferença no número de embriões transferíveis recuperados na primeira (5,0), segunda (5,4) e terceira (3,5) coletas consecutivas em ovelhas da raça Rasa Aragonesa. Assim como Cordeiro *et al.* (2003) em ovelhas da raça Santa Inês, citam que as mesmas responderam a tratamento de superovulação com FSH sem nenhuma evidência para uma redução nas respostas a duas coletas sucessivas num intervalos de 90 dias. Mas para Quan *et al.* (2011) a repetição de sucessivos tratamentos superovulatórios pode reduzir o número de ovelhas utilizáveis para coleta de embriões, além de diminuir o número de embriões coletados.

A técnica de coleta de embriões pode influenciar no resultado dos programas de MOTE, sendo o método cirúrgico o mais utilizado. Neste podem ocorrer problemas como aderências e diminuição no número e qualidade dos embriões coletados (Gibbons & Cueto, 2011). Ramon-Ugalde *et al.* (2008) obtiveram uma média de 5,9 vs 3 embriões recuperados por lavagem no oviduto e útero, respectivamente. Mas a coleta de embriões por técnica não cirúrgica também pode ser utilizada, como demonstrado por Gusmão *et al.* (2007) que realizaram coleta transcervical em ovelhas Santa Inês e conseguiram uma média de quatro embriões viáveis, em ovelhas Dorper, encontraram valores médios de 3,5 para embriões viáveis (Gusmão *et al.* 2009).

Gonzalez-Bulnes *et al.* (2005) relatam que o número e a viabilidade de embriões obtidos *in vivo* aumenta quanto a superovulação inicia no começo da fase luteal do ciclo estral, permitindo a presença de um CL durante o tratamento com progestágenos.

A taxa de ovulação e o número de embriões recuperados estão relacionados com o número de pequenos (2 - 3 mm) folículos responsivos a gonadotrofina, presentes no ovário na primeira administração de FSH (Gonzalez-Bulnes & Veiga-Lopez, 2005). Bem como, folículos imaturos ou no início de atresia, que são estimulados a crescer pelo tratamento com FSH podendo ser uma das causas para a anovulação (Veiga-Lopez *et al.* 2005). Lopez-Alonso *et al.* (2005) indicam que a utilização de um antagonista de GnRH administrado antes do início da SOV suprime o efeito do fólculo dominante, acarretando um aumento de pelo menos dois folículos responsivos as gonadotrofinas, contribuindo para aumento na produção de embriões viáveis.

Em estudo retrospectivo, Gonzalez-Bulnes & Veiga-Lopez (2008) observaram que a presença de um folículo dominante age de forma negativa no número e viabilidade dos embriões obtidos no ovário ipsilateral em ovinos estimulados com FSH, dando evidência a

existência de fatores locais que afetam o final do desenvolvimento de folículos subordinados vizinhos de forma independente dos efeitos da dominância mediados por FSH.

A maioria dos folículos secreta baixas concentrações de estrógenos e isso não afetou a viabilidade dos ovócitos e embriões, mas a presença de folículos altamente estrogênicos pode influenciar negativamente a resposta superovulatória devido a uma diminuição da taxa de fertilização (Veiga-Lopez *et al.* 2006). Em situação de estresse a frequência e a amplitude dos pulsos de GnRH/ LH são suprimidos mesmo na presença de baixas ou altas concentrações de estradiol, resultando em problemas reprodutivos (Dobson *et al.* 2012).

A RPCL é um fenômeno comum em cabras e ovelhas superovuladas que recebem grandes doses de FSH e/ ou eCG com o objetivo aumentar o número de folículos ovulatórios, ovulações e embriões. Todavia este estímulo pode se prolongar e os folículos persistentes permanecerem produzindo estrógenos levando à liberação precoce de PGF2 α causando a regressão luteal, como consequência, nota-se um decréscimo na resposta superovulatória (Fonseca, 2005).

A administração de progesterona exógena ou agentes luteotróficos (hCG, GnRH, LH) pode prevenir ou reduzir a luteólise, evitando perdas embrionárias iniciais (Fonseca, 2006). Ainda exerce um importante papel na regulação da secreção de proteínas e de fatores de crescimento pelo útero que são essenciais para o desenvolvimento inicial dos embriões (Lima & Souza, 2009).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 173 – 179, 2012.

ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 33 – 37, 2007.

AMIRIDIS, G. S.; CSEH, 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-ANOVER, 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.

ARASHIRO, E. K. N.; FONSECA, J. F.; HENRY, M.; FIGUEIRA, L. M.; MAGÃO, J. V. P.; OLIVEIRA, D. R.; ESTEVES, L. V.; BRANDÃO, F. Z. Efeito do protocolo de sincronização da primeira onda folicular sobre a resposta a superovulação em ovelhas da raça Santa Inês. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Anais**. Belo Horizonte: CBRA, 2009.

AZAWI, O. I.; AL-MOLA, M. K. M. A. Effect of season and mating system in Awassi ewes superovulated with FSH on fertilization rate and embryo recovery. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 24, n. 2, p. 75 - 79, 2010.

BABY, T. E.; BARTLEWSKI, P. M. Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. **Reproductive Biology**. v. 11, n. 1, p. 19 – 36, 2011.

BARI, F.; KHALID, L. A. M.; WOLF, B.; HARESIGN, W.; MURRAY, T. M. A.; MERRELL, B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. **Theriogenology**, v. 56, p. 147 – 155, 2001.

BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; HUCHKOWSKY, S. L.; EPP, T.; RAWLINGS, N. C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, p. 827 – 836, 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; ALEXANDER, B. D.; RAWLINGS, N. C.; BARRETT, D. M. W.; KING, W. A. Ovarian Responses, Hormonal Profiles and Embryo Yields in Anoestrous Ewes Superovulated with Folltropin-V after Pretreatment with Medroxyprogesterone Acetate-releasing Vaginal Sponges and a Single Dose of Oestradiol-17 β . **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 299 – 307, 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science** v. 124, p. 259 – 268, 2011.

BARTLEWSKI, P. M.; FUERST, K. J.; ALEXANDER, B. D.; KING, W. A. Systemic Concentrations of Endogenous and Exogenous FSH in Anoestrous Ewes Superstimulated with Folltropin-V. **Reproduction Domestic Animal**, v. 44, p. 353 – 358, 2009.

BERLINGUER, F.; GONZALEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; LEONI, G.; MOSSA, F.; BEBBERE, D.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J.A.F. VEIGA-LOPEZ, A.; NAITANA, S. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 32, p. 303 – 314, 2007.

BICUDO, S. D.; RODELLO, L.; BITTENCOURT, R. F.; MONTEIRO, C. D.; CROCOMO, L. F.; FALLEIROS, M. B.; BISCARDE, C. E. A.; OLIVEIRA, T. M. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 167 - 181, 2009.

BETTENCOURT, E. M.; BETTENCOURT, C. M.; SILVA, J. C.; FERREIRA, P.; MANITO, C. I.; MATOS, C. M.; ROMÃO, R. J.; ROCHA, A. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 134 – 139, 2008.

BRUNO-GALARRAGA, M. M.; CUETO, M.; GIBBONS, A. E.; PEREYRA-BONNET, F.; CATALANO, R.; GONZALEZ-BULNES, A. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 120, p. 84-89, 2014.

CAVALCANTI, A. S.; BRANDÃO, F. Z.; NOGUEIRA, L. A. G.; FONSECA, J. F. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, p. 1412 - 1418, 2012.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 105 - 116, 1999.

COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 59, p. 171 - 188, 2003.

CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G.; CAIGUA, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 47 - 55, 2008.

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 Inez 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.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in Merinos maintained under field conditions. **Reproduction Domestic Animal**, v. 46, p. 770 - 775, 2011.

D'ALESSANDRO, A. G.; 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.

DOBSON, H.; FERGANI, D.; ROUTLY, J. E.; SMITH, R. F. Effects of stress on reproduction in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 135 - 140, 2012.

EHLING, C.; WIRTH, P.; SCHINDLER, L.; HADELER, K. G.; DOPKE, H.; LEMME, E.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, v. 60, p. 777 - 787, 2003.

EVANS, A. C. O.; FLYNN, J. D.; QUINN, K. M.; DUFFY, P.; QUINN, P.; MADGWICK, S.; CROSBY, T. F.; BOLAND, M. P.; BEARD, A. P. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. **Theriogenology**, v. 56, p. 923 - 936, 2001.

FISCHER NETO, A. Aplicação comercial das biotécnicas reprodutivas em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl, Belo Horizonte, n. 6, p. 182 - 186, 2009.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Anais: Palestras, 2005.

FONSECA, J. F. **Bioteecnologias da reprodução em ovinos e caprinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, Documento 64, 2006.

FONSECA, J. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; VIANA, J. H. M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 113 - 117, 2011.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; CAMARGO, L. S. A. Produção de Oócitos e Embriões de Pequenos Ruminantes: Passado, Presente e Futuro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, Suplemento 2, p. 337 - 369, 2010.

FIERRO, S.; OLIVERA-MUZANTE, J.; GIL, J.; VIÑOLES, C. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. **Theriogenology**, v. 76, p. 630 – 639, 2011.

FIERRO, S.; GIL, J.; VIÑOLES, C.; OLIVERA-MUZANTE, C. J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology**, v. 79, p. 399 – 408, 2013.

FLEISCH, A.; WERNE, S.; HECKENDORN, F.; HARTNACK, S.; PIECHOTTA, M.; BOLLWEIN, H.; THUN, R.; JANETT, F. Comparison of 6-day progestagen treatment with Chronogest[®] CR and Eazi-breed[™] CIDR[®] G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. **Small Ruminant Research**, v. 107, p. 141 - 146, 2012.

FORCADA, F.; AMER-MEZIANE, M. A.; ABECIA, J. A.; MAUREL, M. C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; ASENJO, B.; VÁZQUEZ, M. I.; CASAO, A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 769 – 776, 2011.

FORCADA, F.; ABECIA, J. A.; LOZANO, J. M.; ZUNIGA, O. Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. **Livestock Production Science**, v. 66, p. 263 – 269, 2000.

GHARBI, I.; FERROUK, M.; DECHICHA, A.; BARIL, G.; BECKERS, J. F.; GUETARNI, D. Follicular status and embryo production in Ouled Djellal ewes breed pretreated with a GnRH agonist. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 117 - 127, 2012.

GIBBONS, A.; CUETO, M. Reproductive biotechnologies for genetic improvement in sheep. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 180 - 185, 2011.

GIBBONS, A.; CUETO, M. I.; BONNET, F. P. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo Cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.95, p. 61 – 64, 2011.

GOMES, M. G. T.; VARAGO, F. C.; HENRY, M. R. J. M.; BORGES, I.; MARTINS, T. L. T.; FERREIRA, D. A. Fatores que interferem na transferência de embriões em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 1, p. 15 - 24, 2014.

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.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SOUZA, C. J. H.; 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 Domestic Animal**, v. 37, p. 357 – 361, 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; BERLINGUER, F.; COCERO, M. J.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LEONI, G.; NAITANA, S.; ROSATI, I.; SUCCU, S.; VEIGA-LOPEZ, A. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances in vivo and in vitro blastocysts output in sheep. **Theriogenology**, v. 64, p. 1392 – 1403, 2005.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A. Ovarian follicular dynamics and dominance effect in sheep. **VI Convegno Nazionale SOFIVET** – Stintino, 2005.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; ARIZNAVARETA, C.; SANCHEZ, M. A.; TRESGUERRESC, J. A. F. ; COCERO, M. J.; FLORES, J. M. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**, v. 63, p. 2523 – 2534, 2005.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A. Evidence of intraovarian follicular dominance effects during controlled ovarian stimulation in a sheep model. **Fertility and Sterility**, v. 89, Suppl 3, p. 1507 – 1513, 2008.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; KIRSCH, J. D.; BILSKI, J. J.; KRAFT, K. C.; WINDORSKI, E. J.; LUTHER, J. S.; VONNAHME, K. A.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Superovulation in Sheep: Number and Weight of the Corpora Lutea and Serum Progesterone. **Sheep & Goat Research Journal**, v. 22, p. 26 – 31, 2007.

GUERRA, M. M. P.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M.; COLETO, Z. F.; SILVA, E. C. B.; MONTEIRO, P. L. J.; CARNEIRO, G. F. Goat reproductive biotechnology in Brazil. **Small Ruminant Research**, 98, 157–163, 2011.

GUSMÃO, A. L.; BISCARDE, C. A.; KIYA, C. K. Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 226 - 231, 2013.

GUSMÃO A. L.; MOURA, A. J. C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, Supl 1, p. 29 - 33, 2005.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; BITTENCOURT, T. C. C.; MARTINS, L. E. P.; GORDIANO, H. D.; BARBOSA, L. P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 313 - 318, 2009.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; BARBOSA, L. P. Colheita Transcervical de Embriões Ovinos da Raça Santa Inês no Semi-árido Nordeste. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 1, 2007.

HOLTZ, W. Recent developments in assisted reproduction in goats. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 95 – 110, 2005.

HUSEIN, M. Q.; ABABNEH, M. M. A new strategy for superior reproductive performance of ewes bred out-of-season utilizing progestagen supplement prior to withdrawal of intravaginal pessaries. **Theriogenology**, v. 69, p. 376 – 383, 2008.

KARACA, F.; ATAMAN, M. B.; OYAN, K. C. Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 81, p. 185 – 188, 2009.

LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de transferência de embriões e fertilização *in vitro* na reprodução de caprinos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.4, p. 43 - 50, 2010.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 194 - 202, 2009.

LOPEZ-ALONSO, C.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; COCERO, M. J.; ROS, J. M.; MCNEILLY, A. S.; GONZALEZ-BULNES., A. Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single short-acting dose of GnRH antagonist. **Theriogenology**, v. 64, p. 1833 – 1843, 2005.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 171 - 182, 2009.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36 - 49, 2008.

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.

MENCHACA, A.; MILLER, V.; SALVERAGLIO, V.; RUBIANES, E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. **Animal Reproduction Science**, v.102, p. 76 – 87, 2007.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Dois novos protocolos para controlar a atividade ovariana em caprinos: protocolo de curta duração para inseminação artificial em tempo fixo e protocolo para transferência de embriões iniciado no dia 0. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, Suplemento, p. 51 - 58, 2006.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p. 113 – 118, 2010.

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDANA, 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.

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1111 – 1117, 2007.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223 - 230, 2012.

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, p. 337 - 369, 2010.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L., TORTORELA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414 - 421, 2010.

OLIVEIRAI, M. E. F.; FERREIRA, M. F. C. M. R.; SOUZA, S. F.; PIERON, 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.

PACHECO, A.; QUIRINO, C. R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 87 - 97, 2010.

QUAN, F.; ZHANG, Z.; AN, Z.; HUA, S.; ZHAO, X.; ZHANG, Y. Multiple factors affecting superovulation in Poll Dorset in China. **Reproduction Domestic Animal**, v. 46, p. 39 – 44, 2011.

RAMON-UGALDE, J. P.; FOLCH, J.; COCERO, M. J.; PIÑA-AGUILAR, R. E.; ALABART, J. L. Embryo recovery from the oviduct in superovulated ewes: a method to improve MOET systems. **Czech Journal Animal Science**, v. 53, n. 4, p. 145 – 151, 2008.

RIBEIRO, L. A. O.; DREYER, C. T.; LEHUGEUR, C. M. Manejo da ovelha durante o encarneamento e a parição: novas técnicas para reduzir perdas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 171 - 174, 2011.

RIZZO, H., FRANÇOIS, D., FASSIER T.; GUITTON, E.; BARIL, G., COGNIE, J.; FATET, A.; GUIGNOT, F; MERMILLOD, P.; PETIT, J. P.; BECKERS, J. F.; REMY, B.; FOUCRAS, G; MEYER, G. Transferência de embriões como ferramenta para formação de rebanho experimental ovino e análise dos fatores que podem maximizar a multiplicação do plantel. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 62 - 65, 2012.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Dinâmica folicular, sincronização do estro e superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, Suplemento 1, p. 251 - 261, 2006.

SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 206 - 221, 2010.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, 197 - 204, 2007.

SILVA, J. C.; COSTA, L. L.; CIDADÃO, 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.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnica de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, 2007.

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.

SOUZA, M. I. L. Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, 220 – p. 225, 2013.

TOOSI, B. M.; SEEKALLU, S. V.; BARRETT, D. M. W.; DAVIES, K. L.; DUGGAVATHI, R.; BAGU, E. T.; RAWLINGS, N. C. Characteristics of peaks in serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 73, p. 1192 – 1201, 2010.

TOOSI, B. M.; DAVIES, K. L.; SEEKALLU, S. V.; ZIEGLER, A. C.; BARRETT, D. M. W.; DUGGAVATHI, R.; RAWLINGS, N. Ovarian Follicular Dominance and the Induction of Daily Follicular Waves in the Ewe. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 122 – 129, 2010.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; DOMINGUEZ, V.; COCERO, M. J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v. 63 p. 1973 – 1983, 2005.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TRESGUERRES, J. A. F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARETA, C.; COCERO, M. J. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, 2006.

VEIGA-LOPEZ, A.; COCERO, M. J.; DOMINGUEZ, V.; McNEILLY, A. L.; GONZALEZ-BULNES, A. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. **Reproductive Biology**, v. 6, n. 3, 2006.

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

TRATAMENTO COM PROGESTERONA E REDUÇÃO DA DOSE DE FSH NO PROTOCOLO “DIA 0” PARA PROGRAMAS DE MÚTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM OVELHAS SANTA INÊS

1 RESUMO

Realizaram-se dois experimentos com objetivo de avaliar os efeitos da utilização de doses reduzidas de FSH e a utilização de progesterona para a SOV com o FSH, na resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas no protocolo “Dia 0”. Fez-se uma pré-sincronização do estro e 84 h após iniciou-se a estimulação ovariana utilizando FSH em 8 aplicações. No experimento 1 os tratamentos diferiram quanto a dose de FSH, sendo T1: 200 mg, T2: 133 mg e T3: 80 mg. Para o experimento 2 no T1 sem P4 e no T2 com P4 inserido 12h antes do início da SOV. As IA foram realizadas com sêmen congelado por via laparoscópica e a coleta de embriões por hemilaparoscopia cinco dias após. No experimento 1 o percentual de doadoras que responderam a SOV foi menor ($p < 0,01$) quando utilizada a dose de 80 mg de FSH do que quando utilizadas as doses de 133 e 200 mg, que foram semelhantes entre si. Observou-se que a média de estruturas coletadas (T1 = 3,92; T2 = 4,29; T3 = 2,23), de embriões viáveis (T1 = 1,54; T2 = 3,86; T3 = 0,33), embriões congeláveis (T1 = 1,38; T2 = 3,29; T3 = 0,33) e a média de CL das ovelhas que responderam a SOV (T1 = 8,46; T2 = 8,14; T3 = 5,67) foram similares entre os tratamentos ($p > 0,05$). No experimento 2 observou-se que a média de estruturas coletadas (T1 = 3,43; T2 = 4,0), de embriões viáveis (T1 = 1,43; T2 = 1,83), embriões congeláveis (T1 = 1,29; T2 = 1,33), a taxa de resposta das doadoras à SOV (T1 = 48,28%; T2 = 41,38%) e a média de CL (T1 = 6,29; T2 = 7,0) foram semelhante ($p > 0,05$). As doses de 200, 133 e 80 mg de FSH para realização da SOV apresentaram resultados semelhantes na produção de embriões, sendo 80 mg pior na resposta superovulatória e a utilização de progesterona exógena durante a SOV não melhora a resposta superovulatória e produção de embriões.

Palavras-chave: embrião, inseminação artificial, ovinos, reprodução, ruminantes.

2 ABSTRACT

There were two experiments to evaluate the effects of using low-dose FSH for SOV and the use of progesterone during the SOV in superovulatory response and embryo production in ewes to the Protocol "Day 0 ". A pre-synchronizing estrus made up to 84 h after started ovarian stimulation utilizing FSH in 8 applications. In experiment 1 the treatments differ in the FSH dose: T1: 200 mg, T2: T3 133 mg and 80 mg. For experiment no 2 at T1 and T2 P4 P4 inserted 12h before the SOV. The inseminations were performed with frozen semen by laparoscopy and the collection of embryos was performed by hemilaparoscopia five days after. In experiment 1 the percentage of donors who responded to superovulation was lower ($p < 0.01$) when used at a dose of 80 mg of FSH when used at doses of 133 and 200 mg were similar. It was observed that the mean collected structures (T1 = 3.92, T2 = 4.29, T3 = 2.23), of viable embryos (T1 = 1.54, T2 = 3.86, T3 = 0.33), and freezable embryos (T1 = 1.38; T2 = 3.29; T3 = 0.33) were similar between treatments ($p > 0.05$). Regarding the amount of CL sheep who responded to SOV, the average ranged between 5.67 and 8.46, with no difference ($p > 0.05$). In Experiment 2, we observed that the mean collected structures (T1 = 3.43, T2 = 4.0) viable embryos (T1 = 1.43, T2 = 1.83) and freezable embryo (T1 = 1, 29, T2 = 1.33) were similar between treatments ($p > 0.05$). The response rate of donors to SOV was similar ($p > 0.05$) in T1 (48.28%) and T2 (41.38%). No difference ($p > 0.05$) between treatments with the average CL (T1 = 6.29, T2 = 7.0). Doses of 200, 133 and 80 mg of FSH to perform the SOV showed similar results in the production of embryos and the use of exogenous progesterone during SOV does not improve superovulatory response and embryo.

Keywords: embryo, artificial insemination, sheep breeding, ruminants.

3 INTRODUÇÃO

Os programas de MOTE em ovinos têm sido intensificados no Brasil nesta última década, especificamente em animais da raça Santa Inês, impulsionados pela alta valorização de seus produtos e pela necessidade de uma rápida multiplicação do material genético (Fischer Neto, 2009). Estes programas tornaram-se possíveis pelo desenvolvimento de vários métodos para controle dos eventos reprodutivos (Gonzales-Bulnes *et al.* 2000). Alguns destes envolvem o uso de hormônios exógenos que modificam a fisiologia do ciclo sexual (Abecia *et al.* 2012). Mas ainda há uma variabilidade muito grande na resposta superovulatória (Menchaca *et al.* 2010).

Os hormônios eCG, FSH e hCG tem sido utilizados para SOV em ovelhas (Amiridis & Cseh, 2012). Essas gonadotrofinas interagem com compartimentos foliculares somáticos e germinais levando à ovulação de um número de ovócitos maior que o normal. Todavia, esta interação é modulada no ovário tornando a resposta imprevisível. Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para elevar o número de embriões viáveis coletados de cabras e ovelhas superovuladas (Fonseca 2005).

Em várias espécies, a presença de grandes folículos no início do tratamento com FSH é relatado por uma baixa população de pequenos folículos, resultando em baixo recrutamento folicular e resposta ovariana ao FSH, bem como afetando a produção de embriões (Menchaca *et al.* 2009). O protocolo “Dia 0” assegura a presença de um grupo de pequenos folículos responsivos ao FSH no momento do início do protocolo de SOV (Menchaca *et al.* 2007).

Protocolos que usam fontes exógenas de progesterona/progestágenos, combinadas com FSH são utilizados com sucesso por muitos pesquisadores e criadores em programas de

MOTE em pequenos ruminantes Ayres *et al.* (2012). Existe uma preocupação com relação aos resíduos hormonais em produtos animais, daí estão sendo feitos esforços para reduzir o uso de hormônios em protocolos reprodutivos.

Bari *et al.* (2000) observaram que as concentrações de P_4 durante a fase folicular tem um papel importante na determinação da taxa de ovulação em fêmeas superovuladas. Assim, Husein & Ababneh (2008) relatam a importância da administração de progestágenos nos programas de indução de ciclos estrais em ovelhas, pois acarreta melhoria do crescimento e desenvolvimento folicular, aumentando o número de grandes folículos com potencial ovulatório (Rubianes & Menchaca, 2006).

Além disso, foi demonstrado que a concentração plasmática de progesterona é baixa imediatamente após a ovulação e durante o período de formação inicial do CL, seguido por aumento na concentração entre os dias 3 e 7 (Bartlewski *et al.* 2011), interferindo assim na produção embrionária. Uma alternativa a esse problema seria a administração de progesterona durante a SOV com o intuito de elevar a eficiência e diminuir a variabilidade da resposta a SOV (Fonseca, 2005).

A superovulação é um tópico que demanda estudos mais aprofundados para determinação de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes e menos onerosos capazes de oferecer uma segurança mínima na resposta superovulatória (Gusmão *et al.* 2013). O estabelecimento de um protocolo para SOV que caracterizem doses menores e mais eficientes de hormônios (Fonseca, 2005) com o intuito de diminuir a variabilidade da produção embrionária se faz necessário, pois iria ter impacto também no custo dos programas de MOTE.

Os objetivos destes experimentos foram avaliar os efeitos da utilização de doses reduzidas de FSH para a SOV e a utilização de progesterona durante a SOV com o FSH na resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês no protocolo “Dia 0”.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local, manejo alimentar e animais

Os experimentos foram realizados na primavera e verão na Fazenda Costa, localizada em Luziânia – GO, latitude: 16° 15' 09" S e longitude: 47° 57' 01" W. Foram utilizadas ovelhas padrão da raça Santa Inês de 1 a 4 anos de idade, com peso variando entre 40 e 60 kg e escore de condição corporal entre 3 e 4, (escala de 1 a 5), para serem doadoras de embriões. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob o protocolo UnBDoc N°62749/2014.

Os animais foram mantidos em pastagem de *Andropogon*, *Bachiaria*, *Massai*, Milheto e receberam ração concentrada a base de soja, milho, sorgo e núcleo comercial. O concentrado foi fornecido uma vez ao dia, após os animais retornarem do pasto, 300 g por animal em baias coletivas e tinham acesso livre a água e sal mineral.

As ovelhas foram avaliadas clinicamente e por ultrassonografia por via transretal para exame do sistema genital antes do início dos tratamentos hormonais. Também foi realizada vaginoscopia para descarte de animais com transtornos inflamatórios vaginais que dificultassem a colocação de implantes de progesterona.

4.2 Protocolo de superovulação e exame ultrassonográfico

Em todos os tratamentos, a pré-sincronização do estro foi obtida com colocação de esponjas vaginais impregnados com 60 mg de MAP (Progespon[®], Intervet Schering-Plough, EUA) durante 6 dias. No sexto dia foi aplicado 300 UI de eCG (Novormon[®], Intervet Schering-Plough, EUA) e 37,5 µg de D - cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina). Uma dose de 18 µg de buserelina (Sincroforte[®], Ouro Fino, Brasil), análogo de GnRH foi dada 36 h após remoção da progesterona.

4.2.1 Experimento 1: Resposta superovulatória de doadoras Santa Inês frente a diferentes doses de FSH

Para a SOV utilizou-se 55 ovelhas da raça Santa Inês divididas em três tratamentos. A estimulação ovariana foi realizada utilizando FSH-p (Folltropin[®], Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc. Canadá), diluído no mesmo volume e administrado via IM em 8 aplicações em doses decrescentes (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5, 5%) com intervalos de 12 h, iniciando-se 84 h após a remoção da esponja. No dia da sétima e oitava aplicações de FSH, foram aplicadas 18,75 µg de D - cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina) e 12 h após a oitava dose de FSH, foi aplicada uma dose de 18 µg de buserelina (Sincroforte[®], Ouro Fino, Brasil), análogo de GnRH. Os tratamentos diferiram quanto à dose hormonal, sendo para o tratamento 1: 200 mg, tratamento 2: 133 mg e tratamento 3: 80 mg (Fig. 2.1).

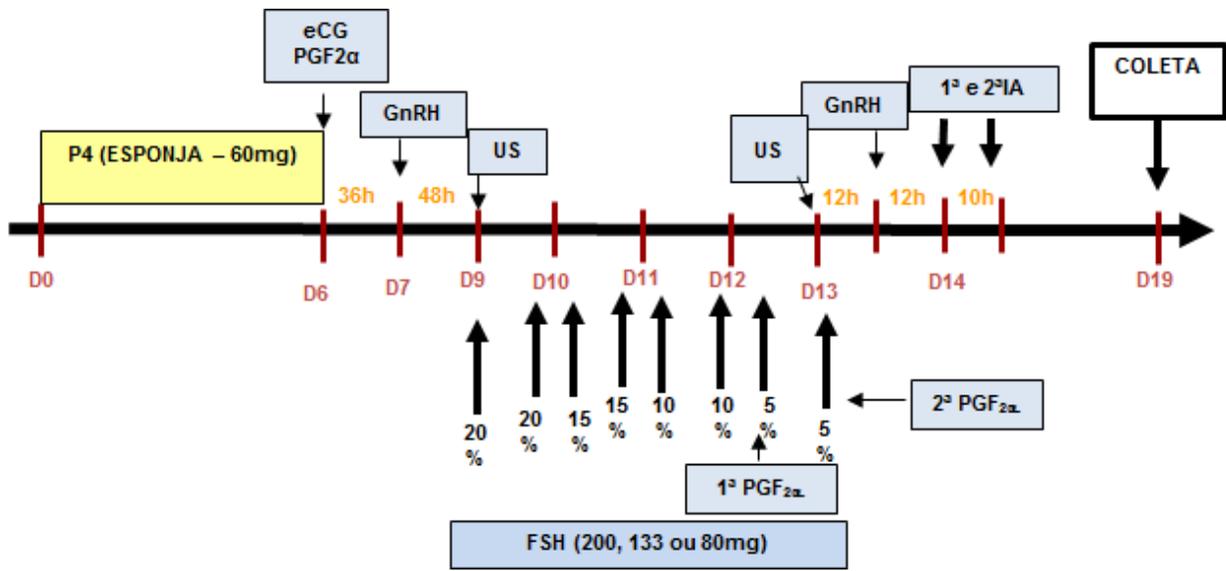


Figura 2.1 Delineamento experimental. Dia 0 (D0): inserção de esponja com 60mg de P₄. Dia 6 (D6): remoção da P₄ e aplicação do D - Cloprostenol Sódico (37,5 µg, IM) e eCG (300 UI, IM). Dia 7 (D7): aplicação de GnRH (18µg de buserelina). Superovulação com FSH realizada duas vezes ao dia entre os dias 9 e 13 (Grupo 200 mg, Grupo 133 mg e Grupo 80 mg). Dias 12 e 13 (D12 e D13): aplicação de duas meias doses de D - Cloprostenol Sódico (18,75 µg, IM). Dia 13 (D13): aplicação de GnRH (18 µg de buserelina). Dia 14 (D14): duas IA com intervalos de 10 h. Dia 19 (D19): coleta de embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados uma vez ao dia na primeira e oitava aplicação de FSH.

4.2.2 Experimento 2: Uso da progesterona durante a superovulação e seu efeito sobre a resposta superovulatória e embrionária de doadoras da raça Santa Inês

Para a SOV utilizou-se 58 ovelhas da raça Santa Inês divididas em dois tratamentos com 29 animais cada. A estimulação ovariana foi realizada utilizando 133 mg de Hormônio Folículo Estimulante da espécie suína – FSH-p (Folltropin[®], Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc., Canadá), diluído no mesmo volume e administrado via IM em 8 aplicações, em doses decrescentes (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5, 5%) com intervalos de 12h, iniciando-se 84h após a remoção dos pessários. No dia da sétima e oitava aplicações de FSH, foram injetados 18,75µg de d-cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina) e 12h após a oitava dose de FSH, foi aplicada uma dose de 18µg de buserelina (Sincroforte[®], Ouro Fino, Brasil), análogo de

GnRH. No tratamento 1, não utilizou-se dispositivo com P4 durante a SOV e no tratamento 2, foi utilizado dispositivo intravaginal contendo 0,3g de progesterona (Eazi- Breed CIDR[®] - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia), inserido 12h antes do início da SOV e retirado no momento da última aplicação de FSH (Fig. 2.2).

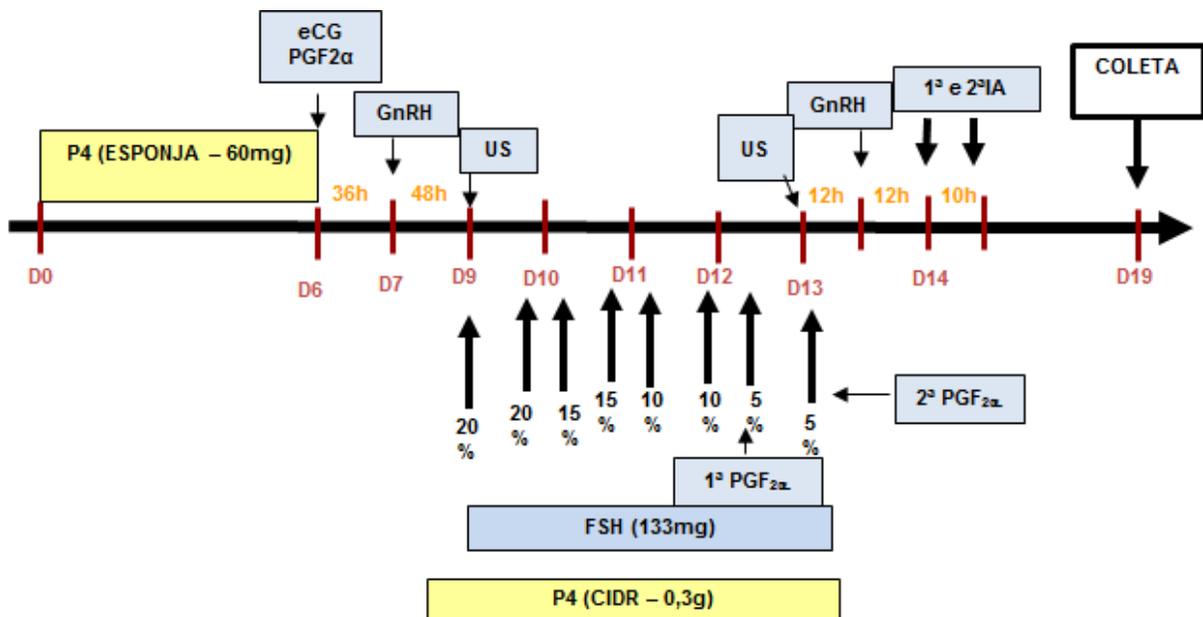


Figura 2.2 Delineamento experimental. Dia 0 (D0): inserção de esponja com 60mg de P4. Dia 6 (D6): remoção da P4 e aplicação do D-Cloprostenol Sódico (37,5 µg, IM) e eCG (300 UI, IM). Dia 7 (D7): aplicação de GnRH (18µg de busserelina). Superovulação com 133mg de FSH realizada duas vezes ao dia entre os dias 9 e 13. (Grupo sem P4). Dia 9 (D9): inserção vaginal de CIDR com 0,3m de P4 (Grupo com P4). Dias 12 e 13 (D12 e D13): aplicação de duas meias doses de D-Cloprostenol Sódico (18,75 µg, IM). Dia 13 (D13): aplicação de GnRH (18µg de busserelina). Dia 14 (D14): duas IA com intervalos de 10h. Dia 19 (D19): coleta de embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados uma vez ao dia na primeira e oitava aplicação de FSH.

Foram realizadas ultrassonografias para avaliação folicular em 50% das doadoras em dois momentos usando scanner modo-B em tempo-real (Mindray 2200 Vet, Shenzhen, China) e transdutor de 7,5 MHz adaptado para exame transretal. O primeiro exame foi realizado no momento da primeira aplicação de FSH, para avaliar o total de folículos presentes nos ovários. O segundo exame foi realizado no momento da última aplicação de FSH, para avaliar a resposta superestimulatória no fim do tratamento gonadotrófico, através da presença de folículos ≥ 4 mm de diâmetro.

4.3 Inseminação artificial

As inseminações foram efetuadas pelo método de laparoscopia desenvolvido por Killen e Caffery (1982) citado por Neves & Luz (1994), realizadas em dois momentos 12 e 22 h após a aplicação da segunda dose de GnRH, por via laparoscópica. Foi utilizado sêmen congelado de um reprodutor da raça Santa Inês com fertilidade comprovada. Utilizou-se 100×10^6 espermatozóides/dose com os parâmetros mínimos para o uso de sêmen congelado, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Previamente as ovelhas foram submetidas a um jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 h, respectivamente. No momento da inseminação as fêmeas foram colocadas em uma maca cirúrgica apropriada, em decúbito dorsal, inclinada cerca de 40°, com a cabeça numa posição inferior aos membros posteriores. 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 média de cada corno uterino, utilizando metade da dose inseminante em cada corno (Neves & Luz, 1994).

4.4 Coleta, avaliação embrionária e resposta superovulatória

A coleta dos embriões foi realizada pela técnica cirúrgica por hemilaparoscopia cinco dias após a IA, utilizando-se anestesia geral com 0,2 mg/ kg IM de xilazina (Rompun[®], Bayer, Brasil) e , 7,5 mg/ kg IM de quetamina (Francotar[®], Virbac, Brasil). No campo cirúrgico destinado ao procedimento de hemilaparoscopia, realizou-se o mesmo procedimento descrito para a IA. Somente as ovelhas que apresentaram número de CL ≥ 3 , com morfologia normal na avaliação da resposta superovulatória realizada por meio de laparoscopia, foram submetidas a

coleta de embriões. Nessas foi realizada anestesia infiltrativa na dose de 0,04 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.

Cada corno uterino foi perfurado próximo à junção útero-tubárica com um angiocat 20 G por onde foram injetados 60 ml de solução salina fosfatada tamponada (Dulbecco Modificado-DPBS[®], Embriocare, Cutilab, Brasil) a 37° C. Os lavados foram recuperados por meio de uma sonda foley nº8 fixada próxima à bifurcação uterina, direto em placas de petri. Os conteúdos recuperados foram levados ao estereomicroscópio utilizando-se objetivas de 10 a 20x para procura dos embriões.

Após as lavagens dos cornos, a cavidade abdominal foi irrigada com solução fisiológica estéril, com a finalidade de minimizar a formação de aderências. As suturas das camadas musculares e subcutânea foram realizadas com fio Catgut 2.0 em sutura simples contínua e a camada dérmica com fio nylon cirúrgico Nº 1.0 em suturas isoladas simples. As doadoras receberam tratamento luteolítico após a coleta, com o objetivo de eliminar embriões remanescentes.

A taxa de recuperação embrionária foi calculada pelo número de estruturas identificadas nos lavados uterinos em relação ao número de CL observados por laparoscopia nas coletas. Considerou-se superovuladas as ovelhas que possuíam mais de três CLs e ovelhas que apresentaram pelo menos um CL regredido com RPCL.

Foram determinados o número de corpos lúteos, total de estruturas, bem como a qualidade e o estágio de desenvolvimento dos embriões recuperados em cada tratamento. Os embriões coletados foram avaliados em esteriomicroscópio com objetiva de 40x quanto à qualidade (I – excelente a V degenerado) e ao estágio de desenvolvimento determinados em: mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido segundo *International Embryo Transfer Society* - IETS (1998). Para estruturas totais foram considerados ovócitos, embriões em seus diversos estágios e degenerados. Embriões viáveis consideraram-se os de graus I a III e embriões congeláveis, somente os de graus I a II. As estruturas inviáveis foram caracterizadas por ovócitos não fecundados e embriões degenerados.

4.5 Tratamento pós-cirúrgico

Os animais foram observados no pós-cirúrgico, quando se realizou o curativo da ferida por 10 dias com limpeza, aplicação de unguento e repelente para insetos. Também foram administrados a cada 24 h, por três dias, antibióticos (Pencivet®) e anti-inflamatórios não esteroides (Flunixin meglumine®), este último a cada 12 h.

4.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa estatístico SAEG 9.1, com a finalidade de aplicação de testes paramétricos e não paramétricos para a análise dos resultados, que foram avaliados quanto à normalidade e homoscedasticidade pelos testes de *LILLIEFORS E BARTLETT*, respectivamente. Os resultados do número de corpos lúteos, embriões viáveis, congeláveis e estruturas inviáveis, foram aplicados os testes de *KRUSKAL-WALLIS* e *WILCOXON*, quando a comparação era três tratamentos ou dois tratamentos, respectivamente. Estruturas totais e folículos visualizados no momento da coleta foram avaliados pela ANOVA e suas médias comparadas pelo teste *t*. Folículos totais no início da SOV e folículos ≥ 4 mm de diâmetro no final da SOV foram avaliados pela ANOVA e suas médias comparadas pelo teste Duncan. Já para taxa de resposta, taxa de recuperação e taxa de regressão precoce de corpo lúteo foi utilizado o teste exato de *FISHER*. Os resultados estão apresentados em Média \pm Desvio Padrão ou porcentagem, e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: Resposta superovulatória de doadoras Santa Inês frente a diferentes doses de FSH

No primeiro experimento foi verificado se a redução da dose de FSH para a realização da SOV apresenta efeito benéfico na resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. Utilizou-se o protocolo “Dia 0” proposto por Menchaca *et al.* (2010) sem nenhuma alteração. Para resposta ao tratamento superovulatório considerou-se as fêmeas que apresentaram ≥ 3 CLs com morfologia e coloração de aspecto fisiológico. Este foi o único resultado que apresentou diferença entre os tratamentos. Todos os outros parâmetros observados foram semelhantes.

O percentual de doadoras que responderam ao tratamento superovulatório foi menor ($p < 0,01$) quando utilizada a dose de 80 mg de FSH do que quando utilizadas as doses de 133 e 200 mg, que foram semelhantes entre si (Tab. 2.1).

Após avaliação laparoscópica, as doadoras que apresentaram pelo menos um CL caracterizando regressão precoce não foram coletadas. Para a RPCL o resultado foi semelhante ($p > 0,05$) entre os três grupos (Tab. 2.1).

Tabela 2.1 Efeito da dose de FSH sobre a resposta superovulatória das doadoras Santa Inês em relação a porcentagem de fêmeas que apresentaram número de CL ≥ 3 e a regressão precoce de corpo lúteo, nos três grupos experimentais (porcentagem).

Resposta das doadoras	200 mg	133 mg	80 mg
Doadoras superovuladas (≥ 3 CL) ¹	68,40% (13/ 19) ^A	38,90% (7/ 18) ^{AB}	16,70% (3/ 18) ^B
Ovelhas com RPCL ²	15,80% (3/ 19)	5, 60% (1/ 18)	11,20% (2/ 18)

1. Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,01$)

2. Regressão precoce de corpo lúteo ($p > 0,05$)

A resposta superestimulatória, apresentou médias variando entre 4,10 e 8,40 folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro no momento da última aplicação de FSH, com tendência a melhores resultados para os grupos 200 e 133 mg de FSH quando comparado com o grupo 80 mg FSH ($p = 0,06$). Folículos totais no início da SOV, bem como folículos visualizados no momento das coletas, não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tab. 2.2).

Com relação à resposta superovulatória determinada pela quantidade de CL das ovelhas que responderam a SOV, a média variou entre 5,67 e 8,46 corpos lúteos, entre os tratamentos, não havendo diferença ($p > 0,05$) (Tab. 2.2).

Tabela 2.2 Efeito da dose de FSH sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês em relação a folículos totais no início da SOV, folículos ≥ 4 mm final da SOV, folículos visualizados no momento da coleta e corpos lúteos nos três grupos experimentais (média e desvio padrão).

Resposta Ovariana	200 mg	133 mg	80 mg
Folículos totais no início da SOV	11,90 \pm 5,67	17,10 \pm 8,89	15,50 \pm 7,25
Folículos ≥ 4 mm final da SOV	8,40 \pm 4,43	6,50 \pm 3,81	4,10 \pm 3,45
Folículos visualizados na coleta	2,70 \pm 3,23	3,00 \pm 3,59	1,40 \pm 2,27
Corpos lúteos	8,46 \pm 3,95	8,14 \pm 3,34	5,67 \pm 4,62

($p > 0,05$)

O número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$) como demonstrado na Tab. 2.3.

Tabela 2.3 Efeito da dose de FSH sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês em relação ao número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação, nos três grupos experimentais (média e desvio padrão).

Produção de embriões	200 mg	133 mg	80 mg
Estruturas Totais	3,92 \pm 2,22	5,43 \pm 3,99	2,33 \pm 2,31
Embriões Viáveis	1,54 \pm 2,63	3,86 \pm 3,98	0,33 \pm 0,58
Embriões Congeláveis	1,38 \pm 2,60	3,29 \pm 3,35	0,33 \pm 0,58
Estruturas Inviáveis	2,38 \pm 1,94	1,57 \pm 3,05	2 \pm 2,65
Taxa Recuperação	46,36% (51/ 110)	68,42% (39/ 57)	41,20% (7/ 17)

($p > 0,05$)

5.2 Experimento 2: Uso da progesterona durante a superovulação e seu efeito sobre a resposta superovulatória e embrionária de doadoras da raça Santa Inês

No segundo experimento foi proposta uma modificação do protocolo “Dia 0” com utilização de um segundo implante vaginal com progesterona inserido 12 h antes do início da SOV e removido no final da SOV. Para a estimulação ovariana utilizou-se a dose 133 mg que apresentou resultados semelhantes a 200 mg no experimento 1. Todos os parâmetros observados foram semelhantes entre os grupos.

A taxa de doadoras superovuladas e que apresentaram RPCL foram semelhantes entre os grupos sem P₄ e com P₄ ($p > 0,05$) (Tab. 2.4). No entanto, pode-se observar que no grupo com P₄, nenhum animal apresentou RPCL.

Tabela 2.4 Efeito da P4 durante a SOV sobre a resposta superovulatória das doadoras Santa Inês em relação a porcentagem de fêmeas que apresentaram número de CL ≥ 3 e a regressão precoce de corpo lúteo, nos dois grupos experimentais (porcentagem).

Resposta das doadoras	Sem P4	Com P4
Doadoras superovuladas (≥ 3 CL)	48,28% (14/ 29)	41,38% (12/ 29)
Ovelhas com RPCL	20,69% (6/ 29)	0% (0/ 29)

($p > 0,05$)

Folículos totais no início da SOV, folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro no momento da última aplicação de FSH, bem como folículos visualizados no momento da coleta e resposta superovulatória não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tab. 2.5).

Tabela 2.5 Efeito da P4 durante a SOV sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês em relação a folículos totais no início da SOV, folículos ≥ 4 mm final da SOV, folículos visualizados na coleta e corpos lúteos nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).

Resposta Ovariana	Sem P4	Com P4
Folículos totais no início da SOV	12,50 \pm 3,90	12,92 \pm 4,01
Folículos ≥ 4 mm final da SOV	10,25 \pm 5,31	13,42 \pm 9,50
Folículos visualizados na coleta	5,42 \pm 4,68	5,67 \pm 5,28
Corpos lúteos	6,29 \pm 4,30	7,00 \pm 4,53

($p > 0,05$)

O número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$) (Tab. 2.6).

Tabela 2.6 Efeito da P4 durante a SOV sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês em relação ao número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação, nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).

Produção de embriões	Sem P4	Com P4
Estruturas Totais	3,43±2,82	4,0±4,2
Embriões Viáveis	1,43±2,85	1,83±2,76
Embriões Congeláveis	1,29±2,87	1,33±2,06
Estruturas Inviáveis	2,00±1,84	2,17±3,35
Taxa Recuperação	48/ 88 (54,55%)	48/ 84 (57,14%)

($P>0,05$)

6 DISCUSSÃO

A variabilidade na resposta superovulatória em cabras e ovelhas doadoras é citada por diversos autores e pode estar relacionada à raça (Ammoun *et al.* 2006), ao estágio folicular no início da estimulação ovariana (Gonzalez-Bulnes & Veiga-Lopez, 2005; Veiga-Lopez *et al.* 2005; Veiga-Lopez *et al.* 2006) e fonte de hormônios utilizados na SOV (Silva *et al.* 2003; Magalhães, 2009; Quan *et al.* 2011) constituindo-se como um grande desafio frente ao aumento da eficiência dos programas de MOTE em pequenos ruminantes. O fato da raça Santa Inês ser formada por três raças distintas pode influenciar na variabilidade das respostas a produção embrionária nesta raça, pois existe a ação inerente as particularidades das raças formadoras somadas aos fatores extrínsecos (pureza, fonte de gonadotrofinas e protocolo de administração), bem como os intrínsecos (nutrição, idade, estado reprodutivo e condições ambientais (Sartori & Mollo, 2007).

A taxa de resposta superovulatória das doadoras pode ser considerada baixa, já que se esperavam respostas a SOV acima de 80% de acordo com os resultados de Menchaca *et al.* (2007) (88% em cabras Alpinas); Menchaca *et al.* (2009) (100% em ovelhas Merinos), Neves *et al.* (2010) (94% em ovelhas Santa Inês) e Brasil (2013) (84,6% em ovelhas Santa Inês) considerando número de CL ≥ 3 .

Os resultados sobre a RPCL foram baixos e estão dentro do esperado isso pode ser atribuído ao uso de GnRH já que segundo Menchaca *et al.* (2010) este hormônio inibe a luteólise precoce por agir na indução da ovulação acarretando uma diminuição dos níveis séricos de estrógeno e inibindo a ação das prostaglandinas. Amiridis & Cseh (2012) atribuem a RPCL ao eCG por apresentar meia vida longa, promovendo o aparecimento de folículos com alta secreção de estrógeno desencadeando a ação da prostaglandina na luteólise, apesar de no presente estudo

esse hormônio ter sido utilizado na pré-sincronização do estro, supõe-se que isso não tenha colaborado para a luteólise precoce.

Alternativas para evitar a RPCL vêm sendo utilizadas com sucesso, como a utilização de fonte exógena de progesterona (Fonseca, 2005) não por acaso no grupo que utilizou tal fonte, nenhuma doadora apresentou regressão de corpo lúteo.

Os valores médios de estruturas recuperadas foram semelhantes aos de Neves *et al.* (2010) com média de 4,5 estruturas totais, mas com 200mg de FSH para SOV em protocolo “Dia 0”; assim como aos de Brasil (2013) com média de 4,8 estruturas totais, que utilizou também 133mg de FSH para SOV em protocolo tradicional, ambos em ovelhas Santa Inês. No entanto, estes resultados estão abaixo dos encontrados por Menchaca *et al.* (2009) em ovelhas Merino, com média de 10,3 estruturas totais, utilizando 240mg de FSH para SOV; e Lima (2013) com média de 11,75 estruturas totais, utilizando 200mg de FSH em ovelhas Santa Inês, ambos no protocolo “Dia 0”. É importante salientar que mesmo em ovelhas Santa Inês, como observado acima, pelos resultados obtidos por outros pesquisadores, ocorre uma variação tanto em relação à dose, quanto ao protocolo utilizado para a SOV.

Durante o período de realização dos dois experimentos o manejo e a nutrição das doadoras não sofreram modificações. Mas houve uma mudança ambiental, uma fase de transição da seca para a chuva, modificando a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar. Essa associação de fatores poderia ter causado maior estresse nos animais contribuindo para diminuição da reposta superovulatória.

No que se refere à taxa de recuperação, calculada pelo número de estruturas identificadas no lavado uterino em relação ao número de CL contados por laparoscopia na coleta, os resultados observados não apresentaram diferença ($p > 0,05$) e são semelhantes aos de Brasil (2013) que observou variação de 37 a 60%; Simoneti *et al.* (2008) variação de 49 a 68% e Forcada *et al.* (2011) variando de 58 a 78%. A taxa de recuperação do presente experimento está dentro do esperado, já que este é um fator sujeito a alta variação nos programas de MOTE em ovinos e está relacionado a protocolos e técnicas de coleta ou até mesmo a experiência dos profissionais que executaram as coletas. Deve-se tentar minimizar a influência dos diferentes fatores para almejar taxas de recuperação próximas as de Cordeiro *et al.* (2003) e Mayorga *et al.* (2011) acima de 80%.

Várias pesquisas apresentam resultados de produção de embriões viáveis com médias acima das obtidas no presente estudo. Como se pode citar os trabalhos de Menchaca *et al.* (2007) 5,9 embriões em cabras; Menchaca *et al.* (2009) 7,9 embriões em ovelhas Merino utilizando 240mg de FSH em protocolo “Dia 0”; Simonetti *et al.* (2008) 7,3 embriões em ovelhas Corriedalle utilizando 176UI de FSH; Forcada *et al.* (2011) 7,8 embriões em ovelhas Ojalada utilizando 280mg de FSH; Wu *et al.* (2011) 8,46 embriões em ovelhas Xinji utilizando 120mg de FSH e os mesmo autores conseguiram 4,78 embriões na mesma raça utilizando 90mg de FSH.

Como observado, existe uma enorme variação nas respostas de produção de embriões relatados por diversos autores em várias regiões do mundo, utilizando protocolos e raças variados, corroborando como a tese de que inúmeros fatores influenciam de forma variável na produção de embriões em ovelhas. Mesmo quando foram comparados os resultados do presente estudo com os de Lima (2013) que utilizou o mesmo protocolo, mesma raça e diferindo somente na dosagem hormonal, observa-se uma acentuada disparidade nos resultados.

A utilização da ultrassonografia permitiu a observação da dinâmica folicular e o estabelecimento de protocolos de SOV iniciando na ausência de grandes folículos dominantes contribuindo para melhoria na produção de embriões. A condição folicular no início do tratamento superestimulatório tem sido relatado como fator de variabilidade na resposta a SOV (Menchaca & Rubianes, 2006). O número de folículos no início da SOV não diferiu entre os tratamentos ($p < 0,05$) e em todos os grupos a taxa de folículo menores que 4 mm de diâmetro foi superior a 85% parecendo ser o protocolo “Dia 0” eficiente em ter a quantidade de folículos potencialmente responsivos ao FSH. Para Rubianes & Menchaca (2006); Menchaca *et al.* (2007) e Menchaca *et al.* (2010) o número total de pequenos folículos recrutados e a taxa de ovulação diminuem com a presença e desenvolvimento do maior folículo da onda, supondo haver a interferência da dominância folicular.

Os grandes folículos inibem o crescimento dos folículos restantes através da supressão de FSH, pela ação da inibina A e estradiol. Assim é importante iniciar um protocolo de superovulação na ausência de grandes folículos, logo após a ovulação, quando o grupo de pequenos folículos estiver crescendo de forma homogênea, pois a quantidade de folículos que podem ser estimulados pelo FSH depende da quantidade de folículos presentes no ovário no momento do início da superovulação.

A presença de folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro observados por meio de ultrassonografia no final da SOV pode ser caracterizada por resposta superestimulatória, no entanto deve-se atentar para o fato de que ainda tem folículos em crescimento e que mesmo não visualizados neste momento, podem atingir tamanho ovulatório e ovular. Brasil (2013) obteve média variando entre 14,33 e 16,18 de folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro, utilizando uma dosagem de 133mg de FSH, a mesma dosagem utilizada no presente estudo.

Com relação à média de folículos visualizados por laparoscopia durante a coleta, não houve diferença entre os tratamentos. Estes podem ser caracterizados por folículos anovulatórios, bem como por folículos maiores que quatro milímetros com potencial ovulatório, fato que pode estar relacionado a não dominância folicular em ovelhas. A relação entre estes folículos e o total de folículos observados por ultrassonografia no momento da primeira dose de FSH variou entre 22,70 e 43,88%, semelhante aos achados de Veiga-Lopez *et al.* (2006). A presença de folículos anovulatórios com concentração elevada de estradiol pode afetar negativamente a produção de embriões e contribuir para a baixa média de embriões viáveis e congeláveis.

A média de CL não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$). Esses resultados estão de acordo com os resultados de Lima (2013) com média de 8,45 no protocolo “Dia 0” em ovelhas Santa Inês. Mas ficaram abaixo dos encontrados por Brasil (2013) em Santa Inês, com média de 11,81 CL utilizando protocolo tradicional, bem como Menchaca *et al.* (2009) em Merinos, com médias de 10,1 CL, Arashiro *et al.* (2009) com média de 10 CL e Neves *et al.* (2010) em Santa Inês, com médias de 9,8, ambos utilizando o protocolo “Dia 0” com 200mg de FSH. Grazul-Bilska *et al.* (2007) relata que o número de CL após a superovulação depende da dose e tipo de hormônio usado.

Folículos visualizados na coleta somados ao número de CL refletem a população de folículos maiores que 4 mm no final da SOV que teoricamente se desenvolveriam até a ovulação. Mas como o desenvolvimento folicular continua após o exame ultrassonográfico alguns folículos não visualizados irão ovular e ocorrer diferença neste quesito. Mas os resultados indicam que não houve diferença neste estudo.

No protocolo “Dia 0” a SOV é iniciada na primeira onda folicular quando os níveis de estrógeno no sangue estão altos e os níveis de progesterona estão baixos, assim os folículos em desenvolvimento da primeira onda ficam expostos por alguns dias a níveis baixos de

progesterona. Existem evidências de que em vacas, uma combinação de baixas concentrações de progesterona e alta concentração de estrógeno durante a fase luteal pode resultar em menores taxas de concepção. Isso possivelmente está relacionado à falta de transporte de ovócitos/ gameta dentro do oviduto e útero, ou com a preparação do útero para apoiar o embrião em desenvolvimento. Mas mesmo quando se utilizou uma fonte exógena de progesterona 12 h antes do início da SOV a resposta superovulatória e a produção de embriões não diferiram entre os tratamentos. Ayres *et al.* (2012) indicam que durante a estação reprodutiva, cabras podem ser superovuladas sem progesterona exógena, utilizando o FSH para recrutar folículos da segunda onda folicular ou seja, 6 - 9 dias após o comportamental do estro.

7 CONCLUSÃO

As doses de 200, 133 e 80 mg de FSH para realização da SOV em ovelhas Santa Inês apresentaram resultados semelhantes na produção de embriões. Na resposta superovulatória o grupo 200 mg foi melhor que o grupo 80 mg e semelhante ao grupo 133 mg, sendo estes semelhantes entre si. A utilização de progesterona exógena durante a SOV não melhorou a resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês no protocolo “Dia 0”.

Com uma dose de 133 mg para a estimulação ovariana e sem a utilização de fonte exógena de progesterona durante a SOV reduz-se os custos dos programas de MOTE, além de corroborar com as recomendações internacionais, no sentido da crescente redução na utilização de hormônios em animais destinados alimentação humana.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 173 – 179, 2012.

AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 152v– 161, 2012.

AMMOUN, I.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J. M.; CONTRERAS, I.; GONZALEZ-ANOVER, 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.

ARASHIRO, E. K. N.; FONSECA, J. F.; HENRY, M.; FIGUEIRA, L. M.; MAGÃO, J. V. P.; OLIVEIRA, D. R.; ESTEVES, L. V.; BRANDÃO, F. Z. Efeito do protocolo de sincronização da primeira onda folicular sobre a resposta a superovulação em ovelhas da raça Santa Inês. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Anais** . Belo Horizonte: CBRA, 2009.

AYRES, S. L.; GAVIN, W.; MEMILI, E.; BEHBOODI, E. Superovulation in goats during the second follicular wave, with or without exogenous progesterone. **Small Ruminant Research**, v. 104, p. 146 – 150, 2012.

BARI, F.; KHALID, L. A. M.; WOLF, B.; HARESIGN, W.; MURRAY, T. M. A.; MERRELL, B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. **Theriogenology**, v. 56, p. 147 – 155, 2000.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science** v. 124, p. 259 – 268, 2011.

BRASIL, Oscar Oliveira. **Maior tempo de exposição à progesterone associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos**. Brasília: Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia da Universidade de Brasília, 2013. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia da Universidade de Brasília, 2013.

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 Inez ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 19 – 23, 2003.

FISCHER NETO, A. Aplicação comercial das biotécnicas reprodutivas em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, n. 6, p. 182 - 186, 2009.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Anais: Palestras, 2005.

FORCADA, F.; AMER-MEZIANE, M. A.; ABECIA, J. A.; MAUREL, M. C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; ASENJO, B.; VÁZQUEZ, M. I.; CASAO, A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 769 – 776, 2011.

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.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A. Ovarian follicular dynamics and dominance effect in sheep. **VI Convegno Nazionale SOFIVET – Stintino**, 31, 2005.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; KIRSCH, J. D.; BILSKI, J. J.; KRAFT, K. C.; WINDORSKI, E. J.; LUTHER, J. S.; VONNAHME, K. A.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Superovulation in Sheep: Number and Weight of the Corpora Lutea and Serum Progesterone. **Sheep & Goat Research Journal**, v. 22, 2007.

GUSMÃO, A. L.; BISCARDE, C. E. A.; KIYA, C. K. Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 226 - 231, 2013.

LIMA, Júlia Timponi de Moura. **Efeito do protocolo de sincronização da onda folicular e do método de acasalamento sobre a produção de embriões em programas de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês**. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, 2013. 69p. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, 2013.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 171 - 182, 2009.

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.

MENCHACA, A.; MILLER, V.; SALVERAGLIO, V.; RUBIANES, E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 76 – 87, 2007.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Dois novos protocolos para controlar a atividade ovariana em caprinos: protocolo de curta duração para inseminação artificial em tempo fixo e protocolo para transferência de embriões iniciado no dia 0. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, Suplemento, p. 51 - 58, 2006.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 113 – 118, 2010.

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDANA, 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.

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1111 – 1117, 2007.

NEVES, J. P.; LUZ, S. L. N. Inseminação laparoscópica em ovelhas com cio natural induzido e sincronizado antes e durante a estação reprodutiva. **Ciência Rural**. v. 24, n. 1, p. 133 - 137, 1994.

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, Suplemento 2, p. 337 - 369, 2010.

QUAN, F.; ZHANG, Z.; AN, Z.; HUA, S.; ZHAO, X.; ZHANG, Y. Multiple Factors Affecting Superovulation in Poll Dorset in China. **Reproduction Domestic Animal**, v. 46, p. 39 – 44, 2011.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Dinâmica folicular, sincronização do estro e superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, Suplemento 1, p. 251 - 261, 2006.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 197 - 204, 2007.

SILVA, J. C.; COSTA, L. L.; CIDADÃO, 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.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; DOMINGUEZ, V.; COCERO, M. J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v. 63, p. 1973 – 1983, 2005.

VEIGA-LOPEZ, A.; COCERO, M. J.; DOMINGUEZ, V.; McNEILLY, A. L.; GONZALEZ-BULNES, A. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. **Reproductive Biology**, v. 6, n. 3, 243 – 264, 2006.

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 3

RESPOSTA NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA EM DOADORAS DA RAÇA SANTA INÊS FRENTE A DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE FSH

1 RESUMO

Este experimento teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes formas de administração de FSH sobre a resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas Santa Inês. Utilizou-se 34 ovelhas divididas em dois tratamentos. Para o protocolo de SOV a sincronização do estro foi obtida com colocação de CIDR vaginais com 0,3 g de P₄ por 14 dias, com troca do dispositivo no sétimo dia, neste também foi aplicado 37,5 µg de D - cloprostenol. A estimulação ovariana foi realizada utilizando 133mg de FSH, no T1 em 8 aplicações em doses decrescentes a cada 12 horas e no T2 em 4 aplicações em doses decrescentes a cada 24 horas, que se iniciou 48 horas antes da remoção do CIDR em ambos os tratamentos. Doze horas depois da retirada do CIDR administrou-se 25 µg de licerelina como indutor de ovulação, 12 e 22 horas após a aplicação desta realizou-se as IA com sêmen congelado por via laparoscópica e a coleta de embriões por hemilaparoscopia cinco dias após as IA. Realizou-se avaliação ultrassonográfica em 50% das doadoras. Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa estatístico SAEG 9.1 com a finalidade de aplicação de testes paramétricos e não paramétricos. Como resultados, observou-se que a média de estruturas coletadas (T1 = 3,47; T2 = 2,55) foram similares entre os tratamentos ($p > 0,05$). No que se refere a embriões viáveis (T1 = 2,40; T2 = 0,82), embriões congeláveis (T1 = 2,07; T2 = 0,82) e média de CL (T1 = 7,47; T2 = 5,73) o grupo oito doses foi melhor que o grupo quatro doses ($p < 0,05$). A taxa de resposta das doadoras à SOV foi semelhante ($p > 0,05$) no T1 (88,24%) e T2 (64,70%). Os resultados sugerem que o protocolo oito doses de FSH a intervalos de 12 horas se mostra como a melhor opção para SOV em ovelhas Santa Inês.

Palavras-chave: embrião, ovelhas, reprodução, ruminante, superovulação.

2 ABSTRACT

This experiment aimed to evaluate the effect of different forms of FSH administration on superovulatory response and embryo production of sheep Santa Ines. We used 34 sheep were divided into two treatments. For the SOV protocol synchronization of estrus was obtained by placing vaginal CIDR with 0.3 g of P4 for 14 days, with device exchange on the seventh day, this was also applied 37.5 µg of D - cloprostenol. Ovarian stimulation was performed with FSH 133mg, 8 in the T1 applications in decreasing doses every 12 hours in 4 and T2 applications in decreasing doses every 24 hours, which started 48 hours before removal of CIDR in both treatments . Twelve hours after CIDR removal was administered 25 g of licerelina as ovulation inducer, 12 and 22 hours after application of this took place the AI with frozen semen by laparoscopy and embryo collection by hemilaparoscopia five days after the IA. Held ultrasound evaluation in 50% of donors. To analyze the results, we used the statistical program SAEG 9.1 for the purpose of application of parametric and non-parametric tests. As a result, it was found that the average collected structures (T1 = 3.47, T2 = 2.55) were similar between groups ($p > 0.05$). With regard to viable embryos (T1 = 2.40, T2 = 0.82), freezable embryo (T1 = 2.07, T2 = 0.82) and mean CL (T1 = 7.47, T2 = 5.73) the eight-dose group was better than the four-dose group ($p < 0.05$). The response rate of donors to SOV was similar ($p > 0.05$) in T1 (88.24%) and T2 (64.70%). The results suggest that the eight-dose protocol FSH and 12 hours intervals appears as the best option for SOV Santa Ines in sheep.

Keyword: embryo, sheep, reproduction, ruminant, superovulation.

3 INTRODUÇÃO

O princípio básico da superovulação é o fornecimento de quantidade elevada de alguns hormônios, em determinados momentos, promovendo ovulações múltiplas. Os principais hormônios utilizados para este fim, são FSH e eCG. O FSH apresenta meia vida curta dificultando seu uso na SOV, devendo para isso ser usado com maior frequência. O eCG devido a RPCL e formação de anticorpos, vem sendo cada vez menos utilizado (Amiridis & Cseh, 2012). O esquema de administração de seis a oito aplicações de FSH e uma de eCG tem sido o protocolo mais utilizado atualmente para SOV em pequenos ruminantes (Simplicio *et al.* 2007).

O protocolo para a SOV em ovelhas mais comumente utilizado é caracterizado pela administração de seis a oito doses de FSH em intervalos de 12 h (Bettencourt *et al.* 2008; Bartlewski *et al.* 2009; Azawi *et al.* 2010; Gharbi *et al.* 2012). Estudos usando protocolos simplificados para SOV em ovelhas apresentam resultados contraditórios (Lehloenya, 2013). O protocolo baseado na redução do número de aplicações de FSH vem sendo testado com sucesso, podendo ser administrado a cada 24 h (Wu *et al.* 2011) ou mesmo em dose única junto com uma dose elevada de eCG (Forcada *et al.* 2011; Simonetti *et al.* 2008). Mas quando se utiliza dose única de FSH sem eCG, as múltiplas injeções de FSH ainda parecem ser o tratamento hormonal mais vantajoso (Cueto *et al.* 2011). Para Grazul-Bilska *et al.* (2007) a resposta superovulatória depende da dose, tipo de hormônio usado, frequência e tempo de tratamento relacionado com a fase do ciclo estral.

O manejo das doadoras durante a realização dos programas de MOTE pode ser estressante, pelo fato da quantidade de hormônios que são aplicados nos animais. Protocolos mais simples, menos estressantes e menos onerosos, que possam apresentar resultados eficientes na

produção de embriões (Fonseca, 2005) poderiam contribuir para o sucesso nos programas de MOTE.

O objetivo deste experimento foi avaliar a resposta superovulatória e produção de embriões, utilizando diferentes formas de aplicação de FSH em ovelhas da raça Santa Inês tendo como base o protocolo tradicional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local, manejo alimentar e animais

O experimento foi realizado no verão na Fazenda Costa, localizada em Luziânia – GO, latitude: 16° 15' 09" S e longitude: 47° 57' 01" W. Foram utilizadas ovelhas padrão da raça Santa Inês de 1 a 4 anos de idade, com peso variando entre 40 e 60 kg e escore de condição corporal entre 3 e 4, (escala de 1 a 5), para serem doadoras de embriões. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob o protocolo UnBDoc N°62749/2014.

Os animais foram mantidos em pastagem de *Andropogon*, *Bachiaria*, *Massai*, Milheto e receberam ração concentrada a base de soja, milho, sorgo e núcleo comercial. O concentrado foi fornecido uma vez ao dia, após os animais retornarem do pasto, 300 g por animal em baias coletivas e tinham acesso livre a água e sal mineral.

Utilizou-se 34 ovelhas da raça Santa Inês divididas em 2 tratamentos com 17 animais cada, que foram avaliadas clinicamente e por ultrassonografia por via transretal para exame do sistema genital antes do início dos tratamentos hormonais. Também foi realizada vaginoscopia para descarte de animais com transtornos inflamatórios vaginais que dificultassem a colocação de implantes de progesterona.

4.2 Protocolo de superovulação – SOV e exame ultrassonográfico

Em todos os tratamentos, a sincronização do estro foi realizada com a utilização de dispositivo intravaginal contendo 0,3 g de progesterona (Eazi- Breed CIDR[®] - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia) durante 14 dias, com troca do dispositivo no sétimo dia, neste dia foi também aplicado 37,5 µg de D - cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina). A estimulação ovariana foi realizada utilizando 133 mg de FSH-p (Folltropin[®], Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc., Canadá). Trinta e seis horas depois de retirado o CIDR, administrou-se 25 µg de licerelina, análogo de GnRH (Gestran Plus[®], Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina). Os tratamentos diferiram quanto ao número de administração hormonal. No tratamento 1: o FSH foi diluído em solução fisiológica e administrado via IM em oito doses decrescentes (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5, 5%) com intervalos de 12 h, iniciando-se 48 h antes da remoção dos pessários; e no tratamento 2: o FSH foi diluído em solução fisiológica e administrado via IM em quatro doses decrescentes (40, 30, 20, 10%) com intervalos de 24 h, iniciando-se 48 h antes da remoção dos pessários (Fig. 3.1).

Foi realizada avaliação ultrassonográfica em 50% das doadoras dos três grupos usando scanner modo-B em tempo real (Mindray 2200 Vet, Shenzhen, China) e transdutor de 7,5 MHz adaptado para exame transretal, no momento correspondente a aplicação do análogo de GnRH, para avaliar a resposta superestimulatória presente no fim do tratamento superovulatório, através da presença de folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro.

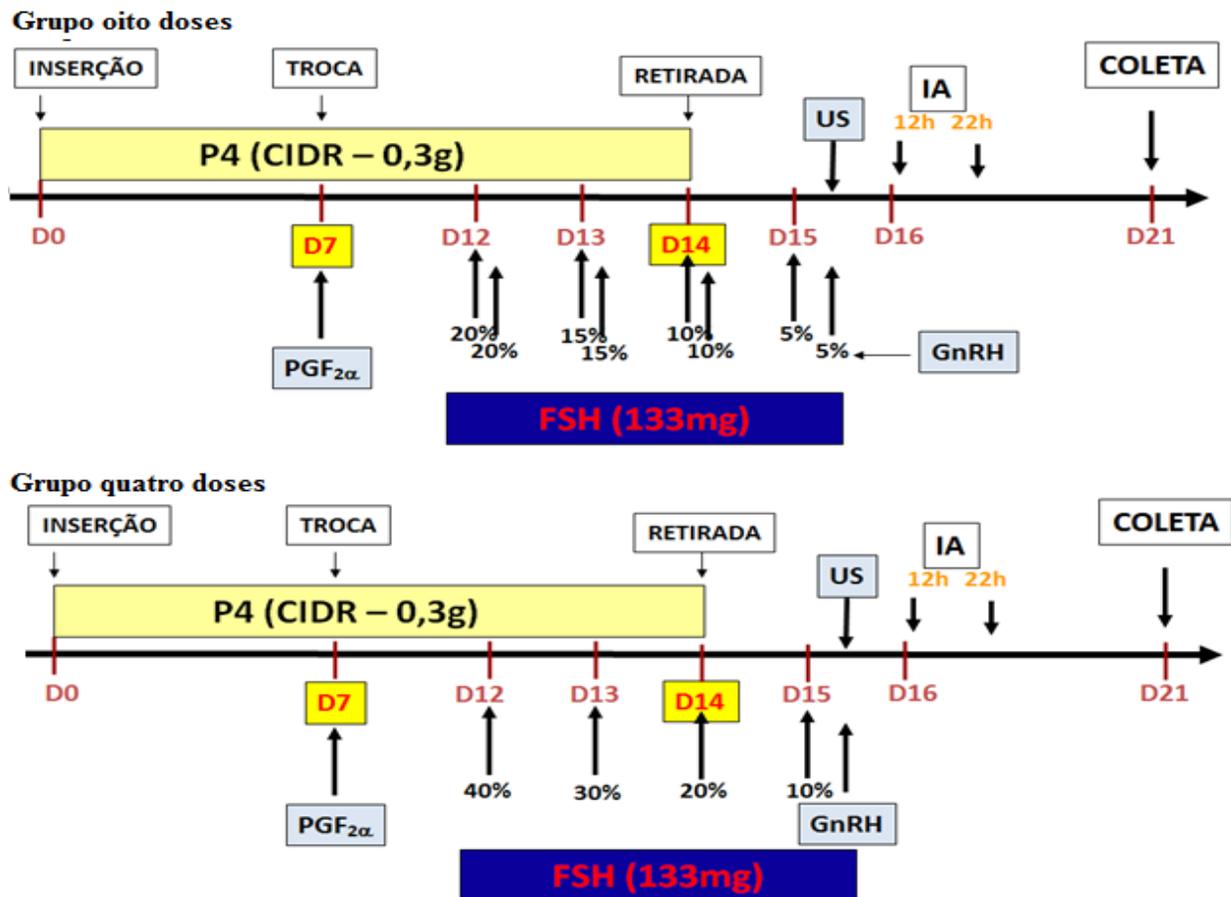


Figura 3.1 Delineamento experimental. Dia 0 (D0): inserção do CIDR com 0,3 g de P₄. Dia 7 (D7): troca do CIDR e aplicação do D - Cloprostenol Sódico (37,5 µg, IM). Dia 14 (D14): remoção do CIDR. Superovulação com 133 mg de FSH realizada duas vezes ao dia entre os dias 12 e 15 (Grupo oito doses); e uma vez ao dia entre os dias 12 e 15 (Grupo quatro doses). Dia 15 (D15): aplicação de GnRH (25 µg de licerelina). Dia 16 (D16): duas inseminações artificiais com intervalos de 10 h. Dia 21 (D21): coleta de embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados no dia da aplicação de GnRH.

4.3 Inseminação artificial

As inseminações foram efetuadas pelo método de laparoscopia desenvolvido por Killen e Caffery (1982) citado por Neves & Luz (1994), realizadas em dois momentos 12 e 22 h após a aplicação da segunda dose de GnRH, por via laparoscópica. Foi utilizado sêmen congelado de um reprodutor da raça Santa Inês com fertilidade comprovada. Utilizou-se 100 x

10^6 espermatozoides/dose com os parâmetros mínimos para o uso de sêmen congelado, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Previamente as ovelhas foram submetidas a um jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 h, respectivamente. No momento da inseminação as fêmeas foram colocadas em uma maca cirúrgica apropriada, em decúbito dorsal, inclinada cerca de 40°, com a cabeça numa posição inferior aos membros posteriores. 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 média de cada corno uterino, utilizando metade da dose inseminante em cada corno (Neves & Luz, 1994).

4.4 Coleta, avaliação embrionária e resposta superovulatória

A coleta dos embriões foi realizada pela técnica cirúrgica por hemilaparoscopia cinco dias após a IA, utilizando-se anestesia geral com 0,2 mg/ kg IM de xilazina (Rompun[®], Bayer, Brasil) e 7,5 mg/ kg IM de quetamina (Francotar[®], Virbac, Brasil). No campo cirúrgico destinado ao procedimento de hemilaparoscopia, realizou-se o mesmo procedimento descrito para a IA. Somente as ovelhas que apresentaram número de CL ≥ 3 , com morfologia normal na avaliação da resposta superovulatória realizada por meio de laparoscopia, foram submetidas a coleta de embriões. Nessas foi realizada anestesia infiltrativa na dose de 0,04 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.

Cada corno uterino foi perfurado próximo à junção útero-tubárica com um angiocat 20 G por onde foram injetados 60 ml de solução salina fosfatada tamponada (Dulbecco Modificado-DPBS[®], Embriocare, Cutilab, Brasil) a 37° C. Os lavados foram recuperados por meio de uma sonda foley n°8 fixada próxima à bifurcação uterina, direto em placas de petri. Os

conteúdos recuperados foram levados ao estereomicroscópio utilizando-se objetivas de 10 a 20x para procura dos embriões.

Após as lavagens dos cornos, a cavidade abdominal foi irrigada com solução fisiológica estéril, com a finalidade de minimizar a formação de aderências. As suturas das camadas musculares e subcutânea foram realizadas com fio Catgut 2.0 em sutura simples contínua e a camada dérmica com fio nylon cirúrgico Nº 1.0 em suturas isoladas simples. As doadoras receberam tratamento luteolítico após a coleta, com o objetivo de eliminar embriões remanescentes.

A taxa de recuperação embrionária foi calculada pelo número de estruturas identificadas nos lavados uterinos em relação ao número de CL observados por laparoscopia nas coletas. Considerou-se superovuladas as ovelhas que possuíam mais de três CLs e ovelhas que apresentaram pelo menos um CL regredido com RPCL.

Foram determinados o número de corpos lúteos, total de estruturas, bem como a qualidade e o estágio de desenvolvimento dos embriões recuperados em cada tratamento. Os embriões coletados foram avaliados em estereomicroscópio com objetiva de 40x quanto à qualidade (I – excelente a V degenerado) e ao estágio de desenvolvimento determinados em: mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido segundo *International Embryo Transfer Society* - IETS (1998). Para estruturas totais foram considerados ovócitos, embriões em seus diversos estágios e degenerados. Embriões viáveis consideraram-se os de graus I a III e embriões congeláveis, somente os de graus I a II. As estruturas inviáveis foram caracterizadas por ovócitos não fecundados e embriões degenerados.

4.5 Tratamento pós-cirúrgico

Os animais foram observados no pós-cirúrgico, quando se realizou o curativo da ferida por 10 dias com limpeza, aplicação de unguento e repelente para insetos. Também foram administrados a cada 24 h, por três dias, antibióticos (Pencivet®) e anti-inflamatórios não esteroides (Flunixin meglumine®), este último a cada 12 h.

4.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa estatístico SAEG 9.1, com a finalidade de aplicação de testes paramétricos e não paramétricos para a análise dos resultados, que foram avaliados quanto a normalidade e homossedastilidade pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. Os resultados do número de corpos lúteos, número de embriões viáveis, congeláveis e inviáveis foi aplicado o teste de *WILCOXON*. Estruturas totais e folículos não ovulados visualizados no momento da coleta foram avaliados pela ANOVA e suas médias comparadas pelo teste *t* e folículos maiores que 4mm de diâmetro no final da SOV foram avaliados pela ANOVA e suas médias comparadas pelo teste de Duncan. Para taxa de recuperação, taxa de resposta e taxa de regressão precoce de corpo lúteo foi utilizado o teste exato de *FISHER*. Os resultados estão apresentados em Média \pm Desvio Padrão ou porcentagem, e as diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Com relação à frequência de doadoras superovuladas (fêmeas que apresentaram uma quantidade de corpos luteos ≥ 3) (Tab. 3.1) não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos oito doses (88,24%) e quatro doses (64,70%) ($p < 0,05$).

A regressão prematura dos corpos lúteos (RPCL) foi semelhante entre os dois grupos ($p > 0,05$) (Tab. 3.1).

Tabela 3.1 Efeito de diferentes esquemas de aplicação de FSH sobre a resposta superovulatória das doadoras Santa Inês em relação à porcentagem de fêmeas que apresentaram número de CL ≥ 3 e a regressão precoce de corpo lúteo, nos dois grupos experimentais.

Resposta das doadoras	Oito doses	Quatro doses
Doadoras superovuladas (≥ 3 CL) ¹	88,24% (15/ 17) ^A	64,70% (11/ 17) ^A
Ovelhas com RPCL ²	5,88% (1/ 17)	0% (0/ 17)

1. Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

2. Regressão precoce de corpo lúteo ($p > 0,05$)

A resposta superestimulatória, avaliada através de ultrassonografia pelo número de folículos maiores ou iguais a 4 mm de diâmetro no momento da última aplicação de FSH, apresentou média variando entre 9,33 e 11,56, não diferindo entre os dois grupos ($p > 0,05$). Já a resposta superovulatória apresentou diferença ($p \leq 0,05$), sendo o grupo oito doses superior (7,47 CL) ao grupo quatro doses (5,73 CL) (Tab. 3.2).

Com relação aos folículos observados durante a coleta, o grupo oito doses ($0,33\pm 0,71$) foi superior ao grupo quatro doses ($2,33\pm 1,50$) ($p < 0,05$).

Tabela 3.2 Efeito de diferentes esquemas de aplicação de FSH sobre a resposta ovariana das doadoras Santa Inês em relação a folículos ≥ 4 mm final da SOV, folículos visualizados na coleta e corpos lúteos nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).

Resposta Ovariana	Oito doses	Quatro doses
Folículos ≥ 4 mm final da SOV	11,56 \pm 4,88	9,33 \pm 3,20
Folículos visualizados na coleta	0,33 \pm 0,71 ^A	2,33 \pm 1,50 ^B
Corpos lúteos	7,47 \pm 3,64 ^A	5,73 \pm 1,95 ^B

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

O número total de estruturas coletadas e taxa de recuperação foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$). Com relação aos embriões viáveis e embriões congeláveis, observou-se que o grupo oito doses apresentou melhor resultado que o grupo quatro doses ($p < 0,05$) (Tab. 3.3).

Tabela 3.3 Efeito de diferentes esquemas de aplicação de FSH sobre a produção embrionária das doadoras Santa Inês em relação ao número total de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões congeláveis, estruturas inviáveis e taxa de recuperação, nos dois grupos experimentais (média e desvio padrão).

Produção de embriões	Oito doses	Quatro doses
Estruturas Totais	3,47 \pm 2,50	2,55 \pm 1,44
Embriões Viáveis	2,40 \pm 2,80 ^A	0,82 \pm 1,40 ^B
Embriões Congeláveis	2,07 \pm 2,12 ^A	0,82 \pm 1,40 ^B
Estruturas Inviáveis	1,07 \pm 1,62	1,73 \pm 1,35
Taxa Recuperação	46,43% (52/ 112)	44,44% (28/ 63)

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

A resposta superovulatória da raça Santa Inês no presente estudo foi similar a resultados encontrados por Neves *et al.* (2010) e Brasil (2013) quando utilizaram mesma raça e tratamento com oito doses. Bem como, a outros autores (Forcada *et al.* 2011; Simonette *et al.* 2008; Menchaca *et al.* 2009) utilizando outras raças. Mas essa comparação é difícil devido às peculiaridades de cada raça. Aliado a isso, de acordo com Sartori & Mollo (2007), somam-se os fatores extrínsecos (pureza, fonte de gonadotrofinas, protocolo de administração e condições ambientais), bem como os intrínsecos (nutrição, idade e estado reprodutivo).

Apesar de estudos demonstrarem que o FSH apresenta alto nível de concentração por volta de 8 h de administração (Amoun *et al.* 2006) o grupo com quatro doses administradas a cada 24 h apresentou uma taxa de resposta superovulatória semelhante ao grupo oito doses, evidenciando a eficácia desse hormônio mesmo com o aumento do intervalo entre as aplicações. Podendo haver uma relação entre a farmacocinética do FSH com a raça e assim haver uma resposta diferencial dos folículos ovarianos entre as raças.

Os resultados sobre a RPCL foram baixos e estão dentro do esperado (Varago, 2009; Brasil, 2013), no entanto isso pode ser atribuído ao uso de GnRH, já que segundo Menchaca *et al.* (2010), este hormônio inibe a luteólise precoce.

A variável número de estruturas totais para os tratamentos oito doses ($3,47 \pm 2,50$) e quatro doses ($2,55 \pm 1,44$), não diferiu entre si ($P > 0,05$). Estes resultados foram semelhantes aos de Brasil (2013) com média de 4,8 estruturas totais em protocolo tradicional (oito doses de FSH) em ovelhas Santa Inês. No entanto, diferem de Simonette *et al.* (2008) que obtiveram 3,1 e 7,8 estruturas ao utilizar um protocolo de SOV com quatro doses e oito doses de FSH, respectivamente. Já Forcada *et al.* (2011) obtiveram 10,7 estruturas com seis doses de FSH.

A taxa de recuperação das estruturas identificadas no lavado uterino em relação ao número de CL observados durante a coleta foi semelhante entre os grupos oito doses (46,43%) e quatro doses (44,44%) ($p > 0,05$). Esses resultados são semelhantes aos de Brasil (2013) com variação de 37 a 60%; Simonetti *et al.* (2008) variação de 49 a 68% e Forcada *et al.* (2011) variando de 58 a 78%, mas inferiores aos de Cordeiro *et al.* (2003) com 80% de taxa de recuperação embrionária. Apesar da taxa de recuperação ser influenciada por vários fatores, a comparação com os autores citados evidencia que o resultado deste estudo está dentro do encontrado na literatura. Ainda sim toda equipe que realizou os trabalhos estava bem treinada, não sendo um fator de interferência neste resultado.

A produção de embriões viáveis, congeláveis e quantidade de CL das doadoras que responderam ao protocolo foram melhores ($p < 0,05$) no grupo oito doses quando comparado ao grupo quatro doses. A variação de respostas a produção de embriões relatados por diferentes autores (Simonetti *et al.* 2008; Forcada *et al.* 2011) corroboram como a tese de que diversos fatores influenciam de forma variável na produção de embriões em ovelhas. O grupo quatro doses obteve uma boa taxa de resposta superovulatória, mas não apresentou boa produção embrionária, isso pode estar relacionado à preparação do FSH, pela adequação da dose e via de administração ou mesmo pela forma como as ovelhas eliminam este hormônio.

Experimentos realizados por Simonetti *et al.* (2008) e Forcada *et al.* (2011) mostraram que uma simples dose de FSH para a SOV pode apresentar boa resposta superovulatória e produção de embriões semelhantes ao protocolo dose múltipla. Mas os autores utilizaram além do FSH, também o eCG em dose elevada para a estimulação ovariana. Dessa forma, não fica claro se os resultados satisfatórios são decorrentes do uso do FSH ou da dose elevada de eCG.

Cueto *et al.* (2011) afirmam que atualmente, as múltiplas injeções de FSH ainda parecem ser o tratamento hormonal mais vantajoso para ovelhas da raça Merino na Patagônia. Lehloenya (2013) relata que múltiplas administrações de FSH têm sido mais eficientes para a produção de embriões em cabras Boer na África do Sul. No entanto, Wu *et al.* (2011) apresentaram resultados superiores aos do estudo em questão, utilizando apenas três doses ou dose única de FSH em ovelhas Xinji.

Uma alta variabilidade na produção embrionária entre raças também foi encontrada como demonstrado por diversos autores citados acima. Além disso, existe a resposta

individual dentro da mesma raça o que pode ser um critério para a selecção de indivíduos responsivos aos protocolos de superovulação.

Houve um recrutamento folicular em todos os grupos, e mesmo com aumento de 12 para 24 h de intervalo de administração do FSH, o grupo quatro doses manteve uma concentração de FSH para o desenvolvimento folicular até a ovulação. Assim, pode-se inferir que existe a possibilidade de modificar a forma de administração no grupo quatro doses de IM para SC e ter a possibilidade de resultados melhores na resposta a SOV e produção de embriões.

Ressalta-se ainda o maior número de folículos visualizados na coleta no grupo quatro doses, diferindo do grupo oito doses ($p < 0,05$), fato que pode ter contribuído para uma melhor resposta a SOV deste grupo, tanto em quantidade como em qualidade embrionária. Demonstrando assim, segundo Grazul-Bilska *et al.* (2007), que a resposta a superovulação depende da dose, frequência e tempo de tratamento do hormônio utilizado.

7 CONCLUSÃO

A administração de múltiplas doses de FSH a intervalos de 12 horas se mostra como a melhor opção para SOV em ovelhas Santa Inês, por apresentar melhores resultados na produção de embriões. A administração de FSH em quatro aplicações a intervalos de 24h foi eficaz na taxa de resposta superovulatória, estimulando a superovulação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 152 – 161, 2012.

ARASHIRO, E. K. N.; FONSECA, J. F.; HENRY, M.; FIGUEIRA, L. M.; MAGÃO, J. V. P.; OLIVEIRA, D. R.; ESTEVES, L. V.; BRANDÃO, F. Z. Efeito do protocolo de sincronização da primeira onda folicular sobre a resposta a superovulação em ovelhas da raça Santa Inês. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 18, *Anais*. Belo Horizonte: CBRA, 2009.

AZAWI, O. I.; AL-MOLA, M. K. M. A. Effect of season and mating system in Awassi ewes superovulated with FSH on fertilization rate and embryo recovery. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 24, n. 2, p. 75 - 79, 2010.

BARTLEWSKI, P. M.; FUERST, K. J.; ALEXANDER, B. D.; KING, W. A. Systemic Concentrations of Endogenous and Exogenous FSH in Anoestrous Ewes Superstimulated with Folltropin-V. **Reproduction Domestic Animal** v. 44, p. 353 – 358, 2009.

BETTENCOURT, E. M.; BETTENCOURT, C. M.; SILVA, J. C.; FERREIRA, P.; MANITO, C. I.; MATOS, C. M.; ROMÃO, R. J.; ROCHA, A. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 134 – 139, 2008.

BRASIL, Oscar Oliveira. **Maior tempo de exposição a progesterone associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos**. Brasília: Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia da Universidade de Brasília, 2013. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia da Universidade de Brasília, 2013.

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 Inez 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.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of Season and Superovulatory Treatment on Embryo Yields in Fine-Wool Merinos Maintained Under Field Conditions. **Reproduction Domestic Animal**, v. 46, p. 770 – 775, 2011.
- FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, *Anais*: Palestras, 2005.
- FORCADA, F.; AMER-MEZIANE, M. A.; ABECIA, J. A.; MAUREL, M. C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; ASENJO, B.; VÁZQUEZ, M. I.; CASAO, A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 769 – 776, 2011.
- GHARBI, I.; FERROUK, M.; DECHICHA, A.; BARIL, G.; BECKERS, J. F.; GUETARNI, D. Follicular Status and Embryo Production in Ouled Djellal(Algeria) Ewes Breed Pretreated with a GnRH Agonist. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 117 - 127, 2012.
- GRAZUL-BILSKA, A. T.; KIRSCH, J. D.; BILSKI, J. J.; KRAFT, K. C.; WINDORSKI, E. J.; LUTHER, J. S.; VONNAHME, K. A.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Superovulation in Sheep: Number and Weight of the Corpora Lutea and Serum Progesterone. **Sheep & Goat Research Journal**, v. 22, 2007.
- GUSMÃO, A. L.; BISCARDE, C. E. A.; KIYA, C. K. Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 226 - 231, 2013.
- GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; BARBOSA, L. P. Colheita Transcervical de Embriões Ovinos da Raça Santa Inês no Semi-árido Nordeste. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 1, 2007.
- LEHLOENYA, K. C. Preliminary results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goats. **Small Ruminant Research**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres>.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 113 – 118, 2010.
- MENCHACA, A.; VILARINO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDANA, 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.
- NEVES, J. P.; LUZ, S. L. N. Inseminação laparoscópica em ovelhas com cio natural induzido e sincronizado antes e durante a estação reprodutiva. **Ciência Rural**. v. 24, n.1, p. 133 - 137, 1994.

- 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, Suplemento 2, p. 337 - 369, 2010.
- OLIVEIRA, M. E. F.; FERREIRA, M. F. C. M. R.; SOUZA, S. F.; PIERON, 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.
- SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 197 - 204, 2007.
- SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnica de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, 2007.
- 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.
- VARAGO, Fabiana Cristina. **Superovulação em ovelhas da raça Santa Inês e criopreservação de embriões**. Minas Gerais: Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009. 80p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- 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 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pequenos ruminantes possuem uma importante contribuição para a produção de alimentos no mundo. Ovelhas da raça Santa Inês, são bem adaptadas às condições de clima quente e conseqüentemente, seu melhoramento genético se torna importante para a disseminação de animais de mérito genético que possam ser utilizados em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

As pesquisas por protocolos de superovulação que sejam específicos para cada raça precisam ser realizadas de forma mais intensa, visto que este é um dos fatores que interferem nas respostas a superovulação e produção de embriões. Além disso, a diminuição da quantidade de hormônios utilizados nesses protocolos contribui para a redução dos custos dos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões e ainda, evita o seu uso em excesso em animais destinados a alimentação humana.

O protocolo “Dia 0” como uma alternativa ao tradicional apresenta boa resposta superovulatória e razoável produção de embriões com uma dose de 133mg de FSH e sem a necessidade de utilização exógena de progesterona durante a SOV em ovelhas Santa Inês.

A diminuição do número de aplicações no protocolo tradicional, não apresenta resultados satisfatórios na produção de embriões em ovelhas Santa Inês, no entanto mostra resultados superestimulatórios que podem ser mais bem estudados em pesquisas futuras.