



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERNATIVAS PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE
OVELHAS DESLANADAS**

OSCAR OLIVEIRA BRASIL

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERNATIVAS PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE
OVELHAS DESLANADAS**

OSCAR OLIVEIRA BRASIL

ORIENTADOR: ALEXANDRE FLORIANI RAMOS

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 173D/2016

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BRASIL, O. O. **Alternativas para o aumento da produção embrionária de ovelhas deslanadas**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 87p. 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. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. 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 citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

BB823a	Brasil, Oscar Oliveira Alternativas para o aumento da produção embrionária de ovelhas deslanadas / Oscar Oliveira Brasil; orientador Alexandre Floriani Ramos. -- Brasília, 2016. 87 p. Tese (Doutorado - Doutorado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2016. 1. Superestimulação. 2. Superovulação. 3. Ovino. 4. Embrião. 5. Santa Inês. I. Ramos, Alexandre Floriani, orient. II. Título.
--------	---

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

**ALTERNATIVAS PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE
OVELHAS DESLANADAS**

OSCAR OLIVEIRA BRASIL

**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:

ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, Doutor (EMBRAPA) (ORIENTADOR)

IVO PIVATO, Doutor (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)

RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, Doutor (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)

FELIPE ZANDONADI BRANDÃO, Doutor (UFF) (EXAMINADOR EXTERNO)

SONY DIMAS BICUDO, Doutor (UNESP) (EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 8 de dezembro de 2016.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Dinâmica folicular ovariana	5
3.2 Utilização do estradiol exógeno para o controle da condição folicular ovariana	6
3.3 Superovulação em ovinos	7
3.3.1 Momento de início da superestimulação vs rendimento embrionário	10
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2 - A SINCRONIA DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR NÃO MELHORA O RENDIMENTO EMBRIONÁRIO EM OVINOS SUPEROVULADOS	18
1 RESUMO	19
2 ABSTRACT	20
3 INTRODUÇÃO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Estação experimental e animais	23
4.2 Técnica de ultrassom	23
4.3 Experimento 1	24
4.4 Experimento 2	25
4.5 Análise estatística	27
5 RESULTADOS	29
5.1 Experimento 1	29
5.2 Experimento 2	31
6 DISCUSSÃO	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO OVARIANA COMO FERRAMENTA PARA SELEÇÃO DE OVELHAS DOADORAS EM PROGRAMAS DE SUPEROVULAÇÃO	42
1 RESUMO	43
2 ABSTRACT	44
3 INTRODUÇÃO	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Estação experimental e animais	47
4.2 Procedimento experimental	47
4.3 Técnica de ultrassom	48
4.4 Protocolo utilizado para superovulação e coleta de embriões	49
4.5 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO 4 - AUMENTO DA DOSE DE FSH EM OVELHAS COM HISTÓRICO DE BAIXA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA	61

1 RESUMO	62
2 ABSTRACT	63
3 INTRODUÇÃO	64
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1 Estação experimental e animais.....	65
4.2 Pré-tratamento superovulatório	65
4.3 Delineamento experimental	66
4.4 Coleta de sêmen e inseminação artificial (IA).....	68
4.5 Resposta ovulatória e produção de embriões	68
4.6 Análise estatística	69
5 RESULTADOS	70
6 DISCUSSÃO	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Capítulo 1	
Figura 1	Representação esquemática do recrutamento e das ondas foliculares no ciclo estral da ovelha, mostrando a fase ideal (até um dia após o recrutamento da onda) para o início da superestimulação com gonadotrofinas exógenas; compilada de dados publicados (Scaramuzzi et al., 1993; Toosi et al., 2010). Eixo vertical: tamanho dos folículos durante o ciclo estral da ovelha. Eixo horizontal: dias do ciclo estral da ovelha e padrão de onda folicular (painel superior) e especificação dos dias adequados para aplicação de gonadotrofinas exógenas (painel inferior) (Brasil et al., 2014)
	11
Capítulo 2	
Figura 1	Esquema do tratamento das da raça ovelhas Santa Inês cíclicas que receberam um CIDR no dia 0 (início do experimento) e mantido por 7 dias. Todas as ovelhas foram inseminadas as 36 e 48 h após a remoção do CIDR e o dispositivo, anteriormente utilizado, foi reintroduzido um dia após a segunda inseminação (dia 9). Os ovócitos/embriões foram coletados cirurgicamente, 5 dias após a segunda inseminação
	26
Figura 2	Perfil do diâmetro de estruturas ovarianas, identificadas individualmente (folículos ≥ 3 mm), presentes em cada ovelha (n = 21) durante cada protocolo de sincronização. A avaliação ultrassonográfica dos ovários teve início com a inserção do dispositivo de progesterona (dia -1) e durou até a constatação da regressão do folículo da nova onda recrutada. A linha tracejada representa o padrão de regressão do maior folículo presente no início do tratamento. A linha contínua representa o padrão de emergência, crescimento e início da regressão do maior folículo da nova onda. O painel (a) representa 0,5 mg de E-17 β (n = 7); O painel (b) representa 1,0 mg de E-17 β (n = 7); e (C) representa 2,0 mg de E-17 β (n = 7)
	30
Figura 3	Características foliculares avaliadas por ultrassonografia no dia 3, em ovelhas do grupo E-17 β (barras cinza claras) e controle (barras cinza escuras). A: número de folículos pequenos (1 mm \leq FP < 4 mm; média \pm SD); B: diâmetro médio do maior folículo (média \pm SD); C: ovelhas com folículos médios/grandes (FM/FG \geq 4 mm; percentual). Dentro dos pares de dados, barras com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes (P < 0,01)
	33

Capítulo 3

- Figura 1 Imagem ultrassonográfica dos dois maiores diâmetros do plano sagital do ovário em diferentes fases do ciclo estral. Pró-estro/estro (A) com a presença de um folículo grande (estrela); metaestro (B); diestro (C) com a presença de um corpo lúteo (seta); ovário pequeno (D); e ovário grande (E) 48

Capítulo 4

- Figura 1 Esquema do tratamento das ovelhas Santa Inês que receberam um CIDR no dia 0 (início do experimento) e mantido por 7 dias. Todas as ovelhas receberam, injeções de pFSH I.M, duas vezes ao dia, por um período de 4 dias, com início no dia 4. Uma dose de PGF2 α (250 μ g de cloprostenol) e agonista de GnRH (25 μ g de acetato de gonadorelina) foi administrada I.M. na 5 e 8 a injeção de pFSH, respectivamente. Todas as ovelhas foram inseminadas as 36 e 48 h após a remoção do dispositivo, e um CIDR anteriormente utilizado foi inserido um dia após a segunda inseminação (dia 10). Os ovócitos/embriões foram coletados 7 dias após a remoção do CIDR (dia 14) por laparotomia 66

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Capítulo 2		
Tabela 1	Características foliculares e luteais (Média \pm D.P.) em ovelhas da raça Santa Inês que receberam doses diferentes de estradiol-17 β (E-17 β) um dia após a inserção do dispositivo de progesterona	31
Tabela 2	Resposta ovariana e produção de embriões (Média \pm D.P.) após tratamento com múltiplas doses de pFSH em ovelhas da raça Santa Inês tratadas ou não com 0,5 mg de E-17 β , 24 h após a inserção do CIDR	32
Capítulo 3		
Tabela 1	Correlação (valor r) entre os parâmetros ovarianos, avaliados em diferentes fases do ciclo estral, utilizados para pré-seleção de ovelhas doadoras de embriões	51
Tabela 2	Correlação (valor r) entre a quantidade de folículos e as dimensões ovarianas em diferentes fases do ciclo estral com a resposta superovulatória e rendimento de embriões das ovelhas doadoras	52
Tabela 3	Resposta ovariana e produção embrionária (média \pm desvio padrão) em ovelhas com alta (≥ 7) ou baixa (< 7) quantidade de folículos, em diferentes fases do ciclo estral, submetidas ao protocolo de superovulação	53
Capítulo 4		
Tabela 1	Número de animais agrupados de acordo com o número de CL, em baixa (≤ 6), intermediária (7 a 9) e alta (≥ 10) ovulação, após o primeiro tratamento superovulatório	67
Tabela 2	Resposta ovariana e produção de embriões (Média \pm D.P.) em doadoras da raça Santa Inês com histórico de baixa ou alta resposta ovulatória, submetidas a um segundo tratamento de superestimulação com pFSH	70

RESUMO

ALTERNATIVAS PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS DESLANADAS

Oscar Oliveira Brasil¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

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

A tecnologia de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) é uma ferramenta importante para o melhoramento genético e para a conservação de embriões de animais de raças ameaçadas ou que apresentem características de interesse. Atualmente, ainda existe uma grande variabilidade na resposta superovulatória de ovelhas doadoras de embriões, limitando a difusão dessa biotécnica reprodutiva em condições de campo. Portanto, objetivou-se avaliar diferentes alternativas para aumentar a produção de embriões *in vivo* e reduzir a variabilidade nos resultados de superovulação. Entre as abordagens utilizadas estão: (1) a superestimulação na emergência da onda folicular; (2) metodologias para selecionar as doadoras mais responsivas ao FSH exógeno; e (3) aumento da dose de FSH em ovelhas com histórico de baixa ovulação. A melhoria da superovulação foi conseguida através seleção das doadoras pelo número de folículos ≥ 2 mm, realizada 4,5 dias após pré-tratamento de sincronização e pelo histórico de um prévio protocolo superovulatório. Contudo, a superestimulação iniciada na emergência da onda folicular, a seleção das doadoras pelas medidas ovarianas e o aumento da dose de FSH em ovelha com histórico de baixa ovulação não melhoram a resposta superovulatória e o rendimento embrionário, tornando inviável essas abordagens em programas MOTÉ.

Palavras chaves: superestimulação, superovulação, ovino, embrião, Santa Inês.

ABSTRACT

ALTERNATIVES TO INCREASE EMBRYO PRODUCTION IN HAIR SHEEP

Oscar Oliveira Brasil¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}

¹College of Agronomy and Veterinary Medicine - University of Brasilia, DF, ² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, DF

Technology of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) is an important tool for genetic improvement and embryo conservation of endangered breeds or those exhibit characteristics of interest. Currently, there is a great variability in the super ovulatory response of donor sheep embryos, limiting the spread of this reproductive biotech in field conditions. This study aimed to evaluate different alternatives to increase *in vivo* embryo production and reduce variability in superovulation results. Among the approaches used are (1) superstimulation in the emergence of the follicular wave; (2) methodologies to select the most responsive donors to exogenous FSH; and (3) increase in the dose of FSH in sheep with low ovulation historic. The improvement of superovulation was achieved by donors' selection through of the number of follicles ≥ 2 mm and historic of a previous superovulatory protocol. However, the superstimulation initiated in follicular wave emergence, the selection of the donor by ovarian measures and increasing FSH dose in sheep with low ovulation history does not improve superovulatory response and embryonic yield, making it unnecessary these approaches to MOET programs.

Keywords: superstimulation, superovulation, ovine, embryo, Santa Inês.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura apresenta papel de destaque na produção global de alimentos, com grande importância socioeconômica para as populações de média e baixa renda. No Brasil, o rebanho ovino é formado por aproximadamente 18,4 milhões de cabeças, sendo a região Nordeste a detentora do maior efetivo de animais, seguido pelas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Norte (IBGE., 2015).

O Brasil possui um grande número de raças ovinas localmente adaptadas, com características de rusticidade e fertilidade. A raça Santa Inês é a mais criada nas diferentes regiões, no entanto, esta e muitas outras raças localmente adaptadas, por apresentarem baixos índices zootécnicos, vêm sendo utilizadas em cruzamentos desordenados, resultando na perda de diversidade genética e o risco de extinção de raças localmente adaptadas (Moraes, 2012).

Diante desse cenário, a aplicação de biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vivo* de embriões, é fundamental para os programas de conservação de raças ameaçadas e melhoramento genético animal. A inseminação artificial é a biotécnica mais empregada, contudo apenas o gametoplasma masculino é multiplicado. A produção de embriões *in vivo* é uma importante ferramenta para aumentar a contribuição de fêmeas superiores para o conjunto de genes da população, principalmente se ela for realizada por meio da múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE).

Durante as três últimas décadas, houve um progresso no uso de gametoplasma feminino por meio da MOTE (Cognie, 1999; Menchaca et al., 2010; Brasil et al., 2014; Bartlewski et al., 2016). O sucesso de um programa MOTE é determinado por fatores extrínsecos (estação, manejo, origem e pureza de hormônios e protocolos de administração) e intrínsecos (raça, idade, condição nutricional e reprodutiva) (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Apesar de na atualidade ter-se um maior controle dos fatores extrínsecos, a resposta ovariana

ainda continua variável, sugerindo que os fatores intrínsecos são os principais responsáveis por essa variabilidade (Bruno-Galarraga et al., 2014).

Nos últimos anos houve um avanço nos conhecimentos da biologia ovariana devido à evolução da ultrassonografia transretal em tempo real, que permite o acompanhamento, não invasivo, do crescimento e da regressão dos folículos ovarianos e do corpo lúteo durante todo o ciclo estral (Evans et al., 2000; Seekallu et al., 2010; Toosi et al., 2010; Bartlewski et al., 2011). Muitos estudos indicam que o número de ovulações e o número de embriões viáveis estão relacionados com número de pequenos folículos no início da administração de FSH exógeno (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Gonzalez-Bulnes, Santiago-Moreno, et al., 2002; Mossa et al., 2007). Por outro lado, a taxa de ovulação (Veiga-Lopez et al., 2005) e o número total de embriões transferíveis (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes, Santiago-Moreno, et al., 2002) são afetadas negativamente pela presença de um grande folículo dominante. Além disso, foi observado que existe uma elevada repetibilidade intraindividual após sucessivos tratamentos de superovulação (Cordeiro et al., 2003; Bruno-Galarraga et al., 2014). Isso possivelmente está relacionado à população folicular intrínseca a cada fêmea, e consequentemente, com o desenvolvimento folicular.

As informações atuais indicam que a resposta superovulatória, está intimamente relacionado com a dinâmica folicular. O uso de metodologias que permitam aumentar a resposta e reduzir a variabilidade dos protocolos são altamente desejáveis. Portanto, a sincronia da emergência folicular e a seleção das doadoras mais responsivas a superestimulação poderiam consistir em excelentes alternativas para atingir esses objetivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Melhorar a produção *in vivo* de embriões ovinos através da sincronia da emergência da onda folicular e da utilização de metodologias para selecionar as doadoras mais responsivas ao FSH exógeno.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a eficácia de doses diferentes de 17β -estradiol em promover a atresia dos folículos dominantes e recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular.
2. Avaliar a resposta superovulatória e a produção de embriões, em protocolo com recrutamento da onda folicular, utilizando 17β -estradiol.
3. Avaliar se as medidas ovarianas bidimensionais estão correlacionadas com a resposta superovulatória e rendimento na produção embrionária.
4. Avaliar se a população folicular correlaciona-se com a resposta superovulatória e rendimento embrionário.
5. Avaliar a repetibilidade da resposta ovulatória entre sucessivos protocolos de superovulação.
6. Avaliar o efeito de diferentes doses de FSH em doadoras com histórico de baixa ou alta resposta ovulatória.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Dinâmica folicular ovariana

Em ovinos, dentro de um mesmo ciclo estral, grupos de folículos emergem em momentos intercalados, caracterizando as ondas foliculares (Evans et al., 2000; Evans, 2003a). A partir da observação de flutuações no número de folículos de tamanhos diferentes em intervalos intercalados de um mesmo ciclo estral, evidenciou-se que o crescimento folicular nas ovelhas ocorre em padrão de ondas (Evans et al., 2000).

Em cada onda de crescimento folicular, um a três folículos antrais ovarianos emergem a partir de um *pool* de folículos pequenos (1 a 3 mm) gonadotrofina-dependentes, atingindo diâmetro ≥ 5 mm antes de regressão (onda anovulatória) ou da ovulação (onda ovulatória) (Ginther et al., 1995; Bartlewski et al., 1999; Driancourt, 2001).

Nos ovinos, o número de ondas foliculares por ciclo é de duas a quatro, com alta variação individual, mas com um padrão mais frequentemente encontrado de três ondas foliculares e duração média do intervalo entre ondas de 3 a 5 dias (Noel et al., 1993; Bartlewski et al., 2011).

O desenvolvimento folicular de cada onda é precedido por um aumento nas concentrações séricas de FSH (Scaramuzzi, et al., 2011). As concentrações séricas de estradiol (E2) também aumentam concomitantemente com o crescimento dos folículos em cada onda, com um pico ocorrendo por volta do final da fase de crescimento do maior folículo (Driancourt, 2001), entretanto, em comparação com as outras ondas, a ovulatória é a que possui as maiores concentrações de E2, devido a um aumento na frequência de pulsos de LH durante o final da fase lútea, que estimula a produção desse hormônio (Toosi et al., 2010).

Durante cada onda folicular ocorrem os seguintes eventos: emergência, seleção, desvio e dominância (Evans, 2003a). A emergência folicular ocorre quando um grupo de folículos em crescimento é primeiramente detectado por ultrassonografia. O recrutamento folicular é muitas vezes usado como sinônimo de emergência (Ginther et al., 1996), mas é mais precisamente definido como o crescimento de folículos que se tornam dependentes de gonadotrofinas (Driancourt, 2001). Isso ocorre nos ovinos quando os folículos têm de 2-4 mm de diâmetro.

A seleção folicular é o processo que resulta na redução do número de folículos em crescimento. Essa fase provavelmente acaba quando ocorre uma diferença na taxa de crescimento de um ou mais folículos em relação aos outros folículos (subordinados). O momento em que ocorre uma diferença nas taxas de crescimento tem sido denominado como desvio (Ginther et al., 1996). Um ou mais folículos são considerados dominantes, quando seu crescimento e desenvolvimento são progressivos, ocasionando em retardo ou inibição do crescimento dos folículos subordinados (Evans, 2003a).

O principal efeito relacionado à dominância folicular é a inibição da secreção de FSH através da secreção de inibina A e E2. Os maiores folículos são capazes de mudar a sua dependência de FSH para o hormônio luteinizante (LH) através da aquisição de receptores de LH nas células da granulosa e, assim, continuar a crescer na ausência de FSH. Além disso, em ovinos, há uma evidência da existência de efeitos intraovarianos, no qual os folículos dominantes suprimem outros folículos no mesmo ovário (Gonzalez-Bulnes & Veiga-Lopez, 2008). Embora haja uma evidência da dominância folicular em ovinos e caprinos (Evans, 2003b; Rubianes & Menchaca, 2003), existem algumas diferenças em relação aos descritos para os bovinos. Essas diferenças levaram à hipótese de que a dominância folicular em alguns casos pode ser atenuada em ovelhas. No entanto, a capacidade de folículos grandes bloquearem o aparecimento de uma nova onda folicular foi demonstrada tanto durante a onda ovulatória (Ravindra et al., 1994), na primeira (Evans et al., 2002) e também, durante a segunda onda de crescimento folicular (Seekallu et al., 2009).

3.2 Utilização do estradiol exógeno para o controle da condição folicular ovariana

A combinação de progesterona e estradiol é uma alternativa bem conhecida para sincronizar a emergência da onda folicular em bovinos (Bo et al., 1994; Bo et al., 1995). O

mecanismo responsável pela supressão do folículo dominante e indução do surgimento de uma nova onda folicular parece ser um mecanismo sistêmico (Bo et al., 2000), e envolve tanto a supressão de FSH como de LH por pelo menos 24 horas (Bo et al., 1994). Segundo esses autores, a redução da concentração de E2, permite um aumento das concentrações de FSH que está relacionada ao surgimento de uma nova onda folicular.

As altas concentrações plasmáticas de E2 causam uma supressão transitória, dose-dependente, nas concentrações de FSH (O'rourke et al., 2000). A regressão do folículo dominante foi relacionada a um aumento das concentrações circulantes de E2 por pelo menos 12 horas em ovelhas em anestro (Barrett et al., 2008) e em novilhas (Bo et al., 2000). A administração de 5 mg de estradiol-17 β (E-17 β) resulta no aparecimento de uma nova onda folicular, em média, 4,3 dias mais tarde (Bo et al., 1995), enquanto que a emergência da onda folicular ocorre com 5,5 dias após a administração de 5 mg de benzoato de estradiol (BE) (Martinez et al., 2005). O valerato de estradiol (VE) tem uma meia-vida longa, e, portanto, um efeito supressor prolongado sobre o FSH e crescimento folicular (Bo et al., 1993). Contudo, o tratamento com 1 ou 2 mg de VE resulta em uma emergência folicular mais precoce e mais sincronizada do que 5 mg (Colazo et al., 2005). Portanto, o tempo para a sincronia e emergência da onda folicular parece ser dependente tanto do tipo de estradiol como da dose utilizada.

Poucos estudos têm sido realizados com E-17 β e seus ésteres para recrutamento da onda folicular em ovinos. Meikle et al. (2001), estudando a ação do estradiol-17 β em ovelhas durante o anestro, constataram que a sua utilização provoca a regressão de folículos grandes e sincroniza uma nova onda de crescimento folicular. Barrett et al. (2008) verificaram que a associação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) ao protocolo de acetato de medroxiprogesterona (MAP) e E-17 β foi eficiente na sincronia da emergência da onda folicular e das ovulações.

Contrariamente aos resultados obtidos com a utilização do 17 β -estradiol, o benzoato de estradiol foi utilizado em ovelhas da raça Suffolk, na dose de 0,1 e 0,2 mg associado a uma exposição curta (4 dias) de MAP e não provocou a sincronia da emergência de uma nova onda folicular, bem como, não melhorou a sincronia do estro ou ovulação (Takada et al., 2012).

3.3 Superovulação em ovinos

Em ovinos, os protocolos tradicionais de superovulação consistem de um pré-tratamento com progesterona/progestágeno por 12 ou 14 dias. Durante esse período, seis a oito doses decrescentes de hormônio folículo estimulante (FSH), são administradas duas vezes por dia, começando 48-60 horas antes do fim do tratamento com progesterona/progestágeno (Cognie, 1999; Menchaca et al., 2010; Brasil et al., 2014; Bartlewski et al., 2016). Algumas melhorias no protocolo tradicional são discutidas abaixo.

O tratamento com progesterona/progestágeno por 12 ou 14 dias não apresenta uma boa justificativa. De acordo com trabalhos anteriores, no início dos tratamentos de superestimulação, a alta concentração de progesterona aumenta a resposta ovulatória e rendimento embrionário, indicando-se substituir o pessário de progesterona/progestágeno antes do início das aplicações de FSH (Thompson et al., 1990; Gonzalez-Bulnes, Garcia-Garcia, et al., 2002). Mechaca et al. (2009) demonstraram que em vez de substituir o dispositivo de progesterona/progestágeno em tratamentos longos de 12 ou 14 dias, um protocolo curto (isto é, 5-7 dias) pode ser utilizado sem reduzir o número de corpos lúteos e embriões viáveis.

A superovulação de ovelhas está associada a um elevado grau de regressão prematura de corpo lúteo (RPCL), podendo acontecer em quase 40% das doadoras de embriões (Schiewe et al., 1991). A aplicação de duas doses de 250 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), uma no momento da remoção do pessário vaginal e a outra, 24 horas mais tarde, evita a RPCL, aumenta o peso e o tamanho do corpo lúteo (CL) e as concentrações de progesterona (Shabankareh et al., 2012). Segundo esses autores, a alta concentração de progesterona, provavelmente, faz com que a liberação endometrial de prostaglandina F₂α (PGF₂α) seja mínima e insensível ao estímulo do estradiol e da oxitocina. Por outro lado, o tratamento com progestágeno (FGA) após a inseminação em cabras superestimuladas, embora não evite a RPCL, aumenta a recuperação de embriões, sendo recomendado como uma alternativa para minimizar os efeitos da RPCL nos programas de superovulação (Espinosa-Marquez et al., 2004; Cervantes et al., 2007).

A falha no processo de fertilização é um grande problema nos protocolos superovulatório em pequenos ruminantes. Essa pode ser reduzida com a melhoria da qualidade seminal e com uma maior sincronia das ovulações. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e análogos, administrado no fim da superestimulação, antecipa as ovulações e melhora a sincronia (Walker et al., 1986), resultando em um aumento na taxa de fertilização (Brasil et al., 2016). Além disso, reduz o número de folículos anovulatórios e cistos foliculares (Naqvi & Gulyani, 1999), eleva a taxa de ovulação (Azawi & Al-Mola, 2011) e a produção de embriões viáveis (Menchaca et al., 2009), apesar de relato controverso (Jabbour et al., 1991).

Na tentativa de correlacionar a resposta superovulatória com o fluxo sanguíneo folicular, ovelhas Santa Inês foram submetidas a protocolos curtos e longos, com oito aplicações decrescentes de 200 mg de pFSH. Nesse estudo, não foram encontradas correlações entre o aumento do fluxo sanguíneo e a resposta superovulatória das ovelhas. No entanto, surpreendentemente, foram observadas correlações positivas significativas entre as estimativas quantitativas do fluxo sanguíneo folicular, nas duas últimas aplicações de pFSH, e o número de ovócitos não fertilizados (Oliveira et al., 2014). Devido à existência dessa correlação, os autores sugerem que os protocolos com seis aplicações de pFSH são mais eficientes do que os com oito aplicações.

A combinação de progesterona e estradiol reduz significativamente a variabilidade associada com os tradicionais tratamentos superovulatórios em vacas (Bo et al., 2002; Mapletoft et al., 2002). Em ovelhas em anestro, uma única injeção de estradiol-17 β (E-17 β ; 350 μ g/ovelha) 6 dias depois do tratamento com esponja de medroxiprogesterona resultou no surgimento de uma nova onda com 4-7 dias após o tratamento de E-17 β (Barrett et al., 2008). O mesmo protocolo hormonal foi utilizado antes da superovulação, e reduziu a variabilidade da resposta ovariana e rendimento de embrião após o tratamento com FSH, sem afetar a produção de embriões em ovelhas em anestro (Bartlewski et al., 2008). No entanto, não se conseguiu reprimir e resincronizar a emergência da onda folicular na estação reprodutiva (Bartlewski et al., 2015).

Pensando em um maior controle da população folicular no início da superestimulação Menchaca et al. (2009) desenvolveram o “método do dia 0”, que consiste de iniciar a superestimulação no dia da ovulação, período em que ocorre o surgimento da primeira onda folicular. Segundo esses autores, essa abordagem aumenta o rendimento embrionário em comparação aos protocolos tradicionais. Contudo, outros autores utilizando a mesma metodologia, em ovinos da raça Santa Inês, não conseguiram os mesmos resultados (NEVES, RAMOS & SILVA, 2010; LIMA, 2013).

A seleção das doadoras, através da utilização de dosagens hormonais, pode contribuir para o aumento da resposta superovulatória e redução da variabilidade interindividual. Existe uma forte correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de inibina A durante a superovulação com o número de folículos (Veiga-Lopez et al., 2008) e com o número de corpos lúteos e embriões recuperados (Gonzalez-Bulnes, Santiago-Moreno, et al., 2002). A concentração sérica de E2 no início do tratamento superovulatório é negativamente correlacionado com a produção de embriões transferíveis (Fuerst et al., 2009). Em ovelhas adultas, a concentração de hormônio anti-Mülleriano no início do tratamento com FSH apresenta

uma correlação positiva forte com o número de folículos aspirados por laparoscopia (Lahoz et al., 2014). Portanto, a dosagem desses hormônios pode ser utilizada como potencial preditor do resultado superovulatório. Por outro lado, a identificação das doadoras mais responsivas pode ser conseguida através da seleção das fêmeas com maior número de folículos no início do ciclo estral (Mossa et al., 2007) e pelo histórico de ovulação em um simples tratamento de superovulação com a eCG (Bruno-Galarraga et al., 2014).

3.3.1 Momento de início da superestimulação vs rendimento embrionário

Independentemente do protocolo de superovulação adotado, a condição folicular ovariana, no início do tratamento superestimulatório, é de grande importância para o rendimento embrionário final (Mossa et al., 2007; Veiga-Lopez et al., 2008; Menchaca et al., 2010). Os estudos da influência da condição folicular do ovário, no início de um tratamento superovulatório, mostraram que a resposta ovulatória e o número total de embriões transferíveis são fortemente afetados pelo número de pequenos folículos no primeiro dia do regime superestimulatório (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Mossa et al., 2007). Por outro lado, a taxa de ovulação (Veiga-Lopez et al., 2005) e o número total de embriões transferíveis (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes, Santiago-Moreno, et al., 2002) são afetadas negativamente pela presença de um grande folículo dominante.

Fêmeas com um folículo dominante apresentam alterações no desenvolvimento folicular, que incluem maior atresia, atraso no recrutamento e no crescimento folicular, além de apresentarem folículos com menor tamanho, ovócitos com redução da qualidade e na capacidade de retomada da meiose durante a maturação *in vitro* (Veiga-Lopez et al., 2008). Portanto, é desejável que o tratamento superovulatório inicie durante a emergência da onda folicular ou na ausência de uma dominância estabelecida (Menchaca et al., 2010), como pode ser observado na Figura 1.

Durante os protocolos tradicionais, em 70-85% das doadoras, a superestimulação com FSH é iniciada com presença de grandes folículos ovarianos (Veiga-Lopez et al., 2005; Menchaca et al., 2010). A evidência de que os folículos dominantes podem exercer dominância não só pelas vias sistêmicas, mas também por fatores locais, reforça a necessidade de assegurar que o tratamento superestimulatório se inicie na ausência destes.

Considerando-se a imprevisibilidade da fase de crescimento folicular em ovinos durante os protocolos de sincronização, é de fundamental importância o controle sincronizado

da emergência da onda folicular. Os aspectos do desenvolvimento folicular e o seu controle já foram descritos em ovinos (Meikle et al., 2001; Barrett et al., 2008), devendo esse conhecimento ser considerado para melhorar a eficiência dos programas de produção *in vivo* de embriões ovinos

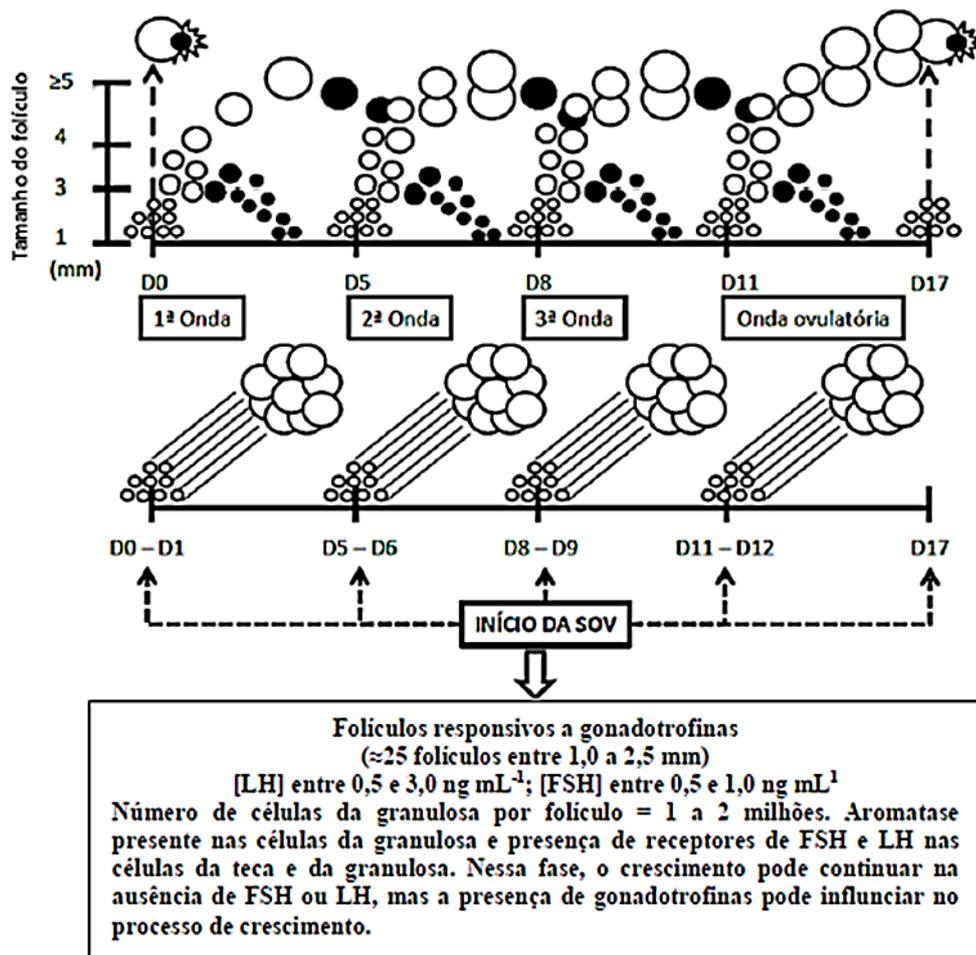


Figura 1. Representação esquemática do recrutamento e das ondas foliculares no ciclo estral da ovelha, mostrando a fase ideal (até um dia após o recrutamento da onda) para o início da superestimulação com gonadotrofinas exógenas; compilada de dados publicados (Scaramuzzi et al., 1993; Toosi et al., 2010). Eixo vertical: tamanho dos folículos durante o ciclo estral da ovelha. Eixo horizontal: dias do ciclo estral da ovelha e padrão de onda folicular (painel superior) e especificação dos dias adequados para aplicação de gonadotrofinas exógenas (painel inferior) (Brasil et al., 2014).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAWI, O. I.; AL-MOLA, M. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 7, p. 1351-1355, Oct 2011.

BARRETT, D. M. W. et al. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anoestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, Apr 2008.

BARTLEWSKI, P. et al. 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 beta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 3, p. 299-307, Jun 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 259-268, Apr 2011.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 111-124, Jan 1999.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 130-143, Jul 2016.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Comparison of the effects of pretreatment with Veramix sponge (medroxyprogesterone acetate) or CIDR (natural progesterone) in combination with an injection of estradiol-17 beta on ovarian activity, endocrine profiles, and embryo yields in cyclic ewes superovulated in the multiple-dose Folltropin-V (porcine FSH) regimen. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1225-1237, Oct 2015.

BO, G. A. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, Aug 1993.

- BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, Jan 1995.
- BO, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17-beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, Jun 1994.
- BO, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, Jan 2002.
- BO, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 3-4, p. 141-157, May 2000.
- BRASIL, O. O.; MOREIRA, N. H.; RAMOS, A. F. Situação atual da superovulação em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 147-153, 2014.
- BRASIL, O. O. et al. Superovulatory and embryo yielding in sheep using increased exposure time to progesterone associated with a GnRH agonist. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 54-58, Mar 2016.
- BRUNO-GALARRAGA, M. M. et al. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 84-89, Jul 2014.
- CERVANTES, M. J. et al. Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 1-2, p. 47-54, Jan 2007.
- COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 105-116, Jan 1999.
- COLAZO, M. G. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1454-1468, Mar 2005.
- CORDEIRO, M. F. et al. Embryo recovery rate in Santa Ines ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 1, p. 19-23, Jul 2003.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, Apr 2001.
- ESPINOSA-MARQUEZ, M. C. et al. Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 624-630, Aug 2004.
- EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 240-246, Aug 2003a.

_____. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 289-306, Oct 2003b.

EVANS, A. C. O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 699-715, Feb 2000.

EVANS, A. C. O. et al. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 59-66, Jan 2002.

FUERST, K. J.; BARTLEWSKI, P. M.; KING, W. A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v. 82, n. 2-3, p. 144-148, Apr 2009.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous-cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 689-703, Feb 1995.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, Dec 1996.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 421-435, 2004.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. **Theriogenology**, v. 54, n. 7, p. 1055-1064, Oct 2000.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; et al. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. **Theriogenology**, v. 58, n. 8, p. 1607-1614, Nov 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; et al. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology**, v. 57, n. 4, p. 1263-1272, Mar 2002.

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, p. 1507-1513, May 2008.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. 2015. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=> >. Acesso em: 01/10/2016.

JABBOUR, H. N. et al. Effects of season, gnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with pMSG and FSH-p to induce superovulation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 3, n. 6, p. 699-707, 1991.

- LAHOZ, B. et al. Anti-Mullerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 347-357, Jan 2014.
- LIMA, J. T. M. **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**. 2013. 69p. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2013.
- MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 6, p. 601-611, Nov-Dec 2002.
- MARTINEZ, M. F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, Mar 2005.
- MEIKLE, A. et al. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrous ewes after treatment with estradiol-17 beta. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 79-90, Jul 2001.
- MENCHACA, A. et al. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 113-118, 2010.
- MENCHACA, A. et al. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 477-483, Sep 2009.
- MORAES, O. R. O. O melhoramento genético dos ovinos. In: PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. FEPMUZ, 2012. p.758.
- MOSSA, F. et al. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3-4, p. 391-396, Aug 2007.
- NAQVI, S. M. K.; GULYANI, R. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. **Small Ruminant Research**, v. 34, n. 2, p. 127-131, Oct 1999.
- NEVES, J. P.; RAMOS, A. F. & SILVA, B. D. M. Alternatives to estrus synchronization and superovulation in ewes in the tropics. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, Supl 2, p. 337 - 369, 2010.
- NOEL, B.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Ovarian follicular dynamics in suffolk ewes at different periods of the year. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 2, p. 695-700, Nov 1993.

- O'ROURKE, M. et al. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1-2, p. 1-12, Apr 2000.
- OLIVEIRA, M. E. F. et al. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 1-2, p. 30-37, Jan 2014.
- RAVINDRA, I. P. et al. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous-cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 2, p. 501-509, Jul 1994.
- RUBIANES, E. et al. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 465-472, Jan 1995.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 271-287, Oct 2003.
- SCARAMUZZI, R. J. et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 5, p. 459-478, 1993.
- SCARAMUZZI, R. J. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 444-467, 2011.
- SCHIEWE, M. C. et al. Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin-f2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 19-30, Sep 1991.
- SEEKALLU, S. V.; TOOSI, B. M.; RAWLINGS, N. C. LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 16, Jul 2009.
- SEEKALLU, S. V. et al. Effects of estradiol and progesterone on circulating LH and FSH secretion, and ovarian antral follicle growth in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 91, n. 2-3, p. 178-185, Jul 2010.
- SHABANKAREH, H. et al. Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG- superovulated Sanjabi ewes. **Trop Anim Health Prod**, Dordrecht, v. 44, n. 8, p. 1865-1871, 2012.
- TAKADA, L. et al. Ovarian response of Suffolk ewes to estrous synchronization using shortterm protocol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 314-319, 2012.
- THOMPSON, J. G. E. et al. The application of progesterone-containing cidrtm devices to superovulated ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1297-1304, Jun 1990.

TOOSI, B. M. et al. 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, n. 9, p. 1192-1201, Jun 2010.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. Features of follicle-stimulating hormone-stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 1328-1337, May 2008.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1973-1983, Apr 15 2005.

WALKER, S. K.; SMITH, D. H.; SEAMARK, R. F. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, n. 1, p. 135-142, May 1986.

CAPÍTULO 2

A SINCRONIA DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR NÃO MELHORA O RENDIMENTO EMBRIONÁRIO EM OVINOS SUPEROVULADOS

1 RESUMO

Acredita-se que a superestimulação com FSH exógeno iniciada no início da onda folicular melhora o rendimento embrionário final. Três diferentes doses de estradiol-17 β (0,5 mg, 1,0 mg e 2,0 mg) em combinação com progesterona foram avaliadas quanto à eficácia em provocar a regressão do maior folículo e emergência de uma nova onda folicular em ovinos. Todas as doses utilizadas causaram a regressão do folículo dominante presente no início do tratamento, mas a dose de 0,5 mg E-17 β foi mais eficiente em sincronizar a emergência da onda folicular. O uso de 0,5 mg E-17 β associado ao protocolo de superovulação permite que administração de pFSH ocorra no início da onda folicular induzida, contudo isso não melhora a resposta superovulatória e a produção de embriões em ovinos.

Palavras chave: embriões, estradiol-17 β , recrutamento, folículo, superovulação

2 ABSTRACT

It is believed that over-stimulation with exogenous FSH initiated at the onset of the follicular wave would improve the final embryo yield. Three different doses of estradiol-17 β (0.5 mg, 1.0 mg and 2.0 mg) in combination with progesterone were evaluated for efficacy in causing regression of the largest follicle and emergence of a new follicular wave in ewes. All doses used regressed the dominant follicle present at the beginning of treatment, but the dose of 0.5 mg E-17 β was more efficient in synchronizing follicular wave emergence. The use of 0.5 mg E-17 β associated with the superovulation protocol allows the pFSH administration to occur at the onset of the follicular wave, but this does not improve superovulatory response and embryo production in ewes.

Keywords: embryos, estradiol-17 β , recruitment, follicle, superovulation

3 INTRODUÇÃO

A tecnologia de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) é realizada nos ovinos para aumentar a progênie das ovelhas de alto mérito genético. O típico protocolo de superovulação envolve 14 dias de exposição a progesterona, com o tratamento com FSH começando cerca de 3 dias antes da remoção do dispositivo de liberação de progesterona (Cognie, 1999; Cognie et al., 2003; Brasil et al., 2016), isto é, em fase aleatória do desenvolvimento da onda folicular. No entanto, um importante fator limitante que ainda afeta o sucesso dos programas MOTE é a variabilidade da resposta ovariana e rendimento de embriões (para revisão, ver Menchaca et al., 2010; Bartlewski et al., 2016). Essa variação é causada por fatores extrínsecos, como origem e pureza dos hormônios e protocolos de administração, e intrínsecos, como raça, idade, condição nutricional e reprodutiva (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Além disso, as diferenças na condição da onda folicular no início dos tratamentos superestimulatórios parecem ser a fonte principal de variabilidade (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Veiga-Lopez et al., 2005; Bartlewski, P. M. et al., 2008), limitando a utilização da superovulação no âmbito comercial e de pesquisa.

Os estudos da influência da condição folicular do ovário, no início de um tratamento superovulatório, mostraram que a resposta ovulatória e o número total de embriões transferíveis são fortemente afetados pelo número de pequenos folículos no primeiro dia do regime superestimulatório (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Bartlewski et al., 2008). Por outro lado, a taxa de ovulação (Veiga-Lopez et al., 2005) e o número total de embriões transferíveis (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2002) são afetadas negativamente pela presença de um grande folículo dominante. Portanto, uma abordagem alternativa seria iniciar os tratamentos de superestimulação subsequentes ao controle exógeno da emergência da onda folicular (Bo et al., 2002; Menchaca et al., 2010).

A sincronização da onda folicular tornou-se habitual em bovinos submetidos a superovulação (Mapletoft et al., 2002). A combinação de progesterona e estradiol (E2) reduz significativamente a variabilidade associada com os tradicionais tratamentos superovulatórios em vacas (Bo et al., 2002; Mapletoft et al., 2002). Espera-se que o mesmo ocorra em ovelhas, mas este tema não foi profundamente estudado, como em bovinos.

Em ovelhas em anestro, uma única injeção de estradiol-17 β (E-17 β ; 0,35 mg/ovelha) 6 dias depois do tratamento com esponja de medroxiprogesterona resulta no surgimento de uma nova onda com 4-7 dias após o tratamento de E-17 β (Barrett et al., 2008). O mesmo protocolo hormonal foi utilizado antes da superovulação, e reduziu a variabilidade da resposta ovariana e rendimento de embrião em ovelhas em anestro (Bartlewski et al., 2008), mas não sincronizou a emergência da onda folicular na estação reprodutiva (Bartlewski et al., 2015), não afetando os resultados de produção de embriões. Em ovelhas cíclicas, nossa equipe, combinando progesterona e E-17 β (2,0 mg/ovelha), provocou o surgimento de uma nova onda folicular com 3-5 dias após o tratamento com estradiol (dados não publicados). Em bovinos, o intervalo de tratamento para emergência sincronizada da onda folicular parece ser dependente da dose de E2 (O'rourke et al., 2000; Martinez et al., 2005), o que é provável de acontecer também em ovelhas.

Dois experimentos foram realizados para avaliar a dinâmica folicular e a produção de embriões em ovelhas cíclicas pré-tratadas com combinação de progesterona e E-17 β . O objetivo do Experimento 1 foi avaliar o efeito da progesterona associada a três doses diferentes de E-17 β sobre a dinâmica folicular ovariana e sincronia da emergência da onda folicular em ovelhas cíclicas. O objetivo do Experimento 2 foi avaliar a resposta ovariana e a produção de embriões em ovelhas cíclicas superestimuladas com gonadotrofina exógena a partir da emergência folicular, após pré-tratamento com progesterona e uma única dose de 0,5 mg de E-17 β .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estação experimental e animais

O estudo foi realizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia localizada em Brasília (região Centro-Oeste do Brasil) a 15°52 de latitude S e altitude variando 1050-1250 m acima do nível do mar. Essa região apresenta um clima tropical chuvoso, com invernos secos e verões chuvosos, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). Preocupações éticas foram tidas em conta em conformidade com os regulamentos local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo CEUA-Cenargen 721/2015).

Ovelhas da raça Santa Inês cíclicas, clinicamente saudáveis, entre 2-5 anos de idade e com o escore de condição corporal $\geq 2,5$ (intervalo 1-5; (Thompson & Meyer, 1994) foram utilizados em todos os experimentos. Uma semana antes do início de cada experimento, foi realizada uma avaliação preliminar, por meio de ultrassonografia transretal, para selecionar ovelhas que apresentavam um ou mais corpos lúteos.

4.2 Técnica de ultrassom

O exame ultrassonográfico dos ovários foi realizado por ultrassonografia transretal com alta resolução, com equipamento de ultrassom modo B em tempo real (DP-2200Vet; Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., Nanshan, Shenzhen, PR China), equipado com um transdutor linear multifrequencial na frequência 7,5 MHz e adaptado

com um cano enrijecido. As ovelhas foram submetidas a ultrassonografia, enquanto mantidas, na posição de estação, em um tronco de contenção. Esta técnica foi validada para o monitoramento da dinâmica folicular ovariana e detecção de CL em ovinos (Vinoles et al., 2004). Um operador experiente realizou todos os exames. Os folículos ovarianos e CL foram medidos utilizando os compassos de calibre eletrônicos interno, e o número, diâmetro e a localização topográfica do CL e de todos os folículos antrais ≥ 1 mm foi esboçado em mapas de ovário.

4.3 Experimento 1

Vinte e uma ovelhas cíclicas (peso corporal médio de 45 ± 7 kg), foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em pastagem de Tifton (*Cynodon spp.*), de 08:00 até 16:45 horas, e após esse período foram alocados em baias coletivas, com uma capacidade de $1,5 \text{ m}^2/\text{animal}$, e alimentados com feno Tifton *ad libitum*. Durante todo o período os animais tiveram livre acesso à água e sal mineral. Todos os animais tiveram o ciclo estral sincronizados com a inserção vaginal (dia -1) de um dispositivo interno de liberação de progesterona (Eazi-Breed CIDR-Controlled Internal Drug Release, InterAg, Hamilton, New Zealand). Um dia após a inserção do dispositivo (dia 0), as ovelhas foram aleatoriamente divididas em três grupos ($n = 7$) para receber 2,0 mg, 1,0 mg ou 0,5 mg de E-17 β I.M. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em 1 mL de óleo de gergelim (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O dispositivo de progesterona foi mantido até o dia da constatação, por ultrassonografia, do início da atresia do folículo dominante da nova onda de crescimento folicular. Por causa do tempo gasto para a avaliação ultrassonográfica da dinâmica folicular, este experimento foi conduzido em duas réplicas, com 12 e 9 animais, respectivamente.

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas no momento da inserção do dispositivo de progesterona, 24 horas mais tarde e, em seguida, a cada 12 horas, até que fosse verificado o início da atresia dos folículos dominantes da nova onda. Os dados foliculares (folículos ≥ 1 mm de diâmetro) foram reunidos para ambos os ovários. A interpretação da dinâmica folicular foi adaptada dos critérios relatado por Bartlewski et al. (1999). A onda folicular foi definida como um grupo de pequenos folículos que deram origem a um ou mais folículos ≥ 4 mm de diâmetro. Para cada onda folicular, o dia da emergência foi definido, retrospectivamente, como o dia em que o maior folículo apresentou 3 mm de diâmetro, seguido

por um aumento do seu diâmetro nas avaliações seguintes. As seguintes características das ondas foliculares foram determinadas para cada ovelha: (1) diâmetro do maior folículo na inserção do CIDR; (2) diâmetro do maior folículo na administração do E-17 β ; (3) diâmetro do CL na administração do E-17 β ; (4) intervalo da administração do E-17 β para a emergência da onda; (5) diâmetro do maior folículo da nova onda; (6) intervalo da administração do E-17 β para regressão da nova onda; (7) duração do crescimento folicular e da fase estática, bem como do comprimento da onda; e (8) taxa de crescimento do maior folículo. A fase de crescimento foi definida como o tempo tomado pelo folículo para crescer entre 3 mm e o seu tamanho máximo; a taxa de crescimento foi calculada pela divisão do crescimento folicular (diâmetro máximo - 3 mm) pela fase de crescimento; a fase estática foi o tempo entre o fim da fase de crescimento até o início da regressão folicular; e o comprimento da onda foi obtido pela diferença do tempo entre o fim da fase estática e o dia da emergência da onda. Durante a fase estática, quando foi observada redução folicular em duas avaliações ultrassonográficas consecutivos, o tempo da primeira avaliação com redução foi determinada como o início da regressão folicular.

4.4 Experimento 2

Sessenta e duas ovelhas cíclicas (peso corporal médio de 41 ± 8 kg), foram utilizados neste estudo. Todas as ovelhas foram mantidas em baias de confinamento e alimentados com feno de Tifton e ração balanceada (150 g/ovelha/dia), com acesso ilimitado à água e sal mineral. As ovelhas foram sincronizadas (4 ou 6 ovelhas/dia) com a inserção vaginal (dia -1) do CIDR e mantido por 7 dias. Um dia após a inserção do CIDR (dia 0), as fêmeas doadoras, foram aleatoriamente divididas em dois grupos ($n = 31$) para receber ou não uma dose de 0,5 mg de E-17 β dissolvido em 1 mL de óleo de gergelim. No dia 3, a superestimulação foi induzida com aplicação de 133 mg de pFSH I.M. (Folltropin[®]-V, Tecnopec, AHC Inc., Bioniche, Canada) em oito doses (20% x 2; 15% x 2; 10% x 2; 5% x 2) administradas duas vezes ao dia, a partir da manhã do dia 3 até 12 horas após a retirada do CIDR. Uma dose de PGF2 α (250 μ g de cloprostenol; Sincrocio[®], Ouro Fino Saúde animal LTDA, Brasil) e de GnRH (25 μ g de acetato de gonadorelina; Gestran Plus, Tecnopec, ARSA SRL, Argentina) foi administrada I.M. na 5^a e 8^a a injeção de pFSH, respectivamente. Além disso, no dia 3, o diâmetro médio do maior folículo e o número de todos os folículos antrais ≥ 1 mm foram

avaliados por ultrassonografia transretal em 12 ovelhas de cada grupo experimental (Figura 1). Os seguintes dados foram registrados: o tamanho médio do maior folículo; o total de folículos pequenos ($1 \text{ mm} \leq \text{FP} < 4 \text{ mm}$); e o percentual de ovelhas com folículos médio ou grandes ($\text{FM}/\text{FG} \geq 4 \text{ mm}$)

O sêmen foi coletado de três carneiros com fertilidade comprovada utilizando uma vagina artificial, e usado em todas as IA. Os carneiros foram previamente selecionados pelas seguintes características seminais: (1) concentração $\geq 3 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$; (2) motilidade massal ≥ 3 ; (3) motilidade espermática $\geq 80\%$; (4) vigor ≥ 3 ; e (5) total de patologias espermáticas $\leq 20\%$ (CBRA, 2013). Todas as fêmeas foram inseminadas, com sêmen fresco, por via cervical. A IA foi realizada às 36 e 48 h após a retirada do CIDR, usando palhetas de 0,5 mL. Imediatamente antes da AI, o sêmen dos carneiros foi coletado, reunido em *pool* e mantido em banho-maria a 33°C. As ovelhas foram contidas com os membros posteriores levantados, e o cérvix foi localizado usando um espécuro vaginal, equipado com uma fonte de luz. O sêmen foi depositado, na medida do possível, o mais profundo dentro do canal cervical, mas sem uso de força. Um dia após a segunda IA, o CIDR, previamente utilizado, foi reintroduzido em cada fêmea e mantido até o momento da coleta de embriões (Figura 1).

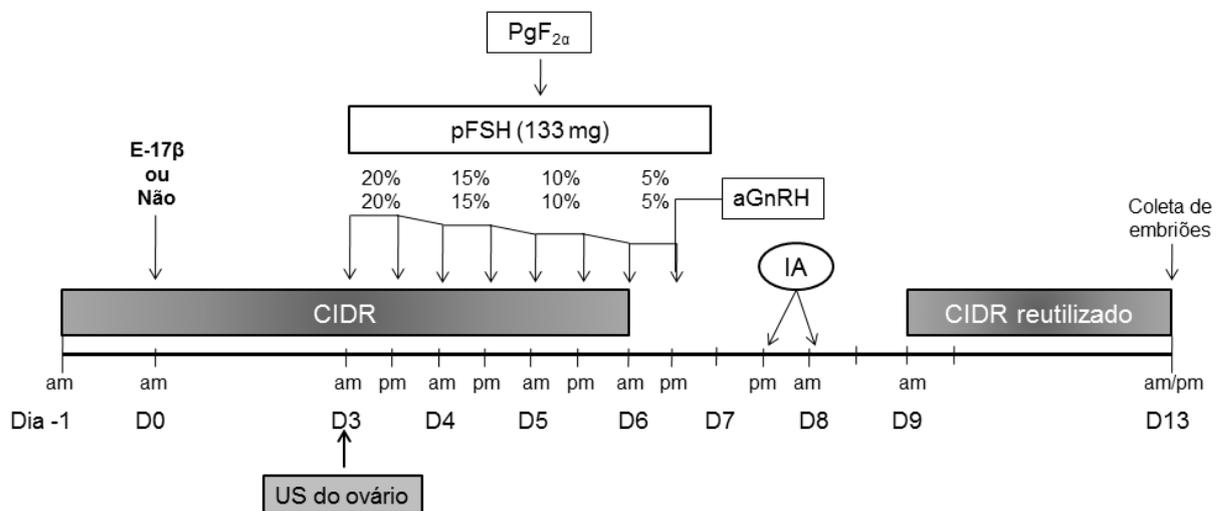


Figura 1. Esquema do tratamento das da raça ovelhas Santa Inês cíclicas que receberam um CIDR no dia 0 (início do experimento) e mantido por 7 dias. Todas as ovelhas foram inseminadas as 36 e 48 h após a remoção do CIDR e o dispositivo, anteriormente utilizado, foi reintroduzido um dia após a segunda inseminação (dia 9). Os ovócitos/embriões foram coletados cirurgicamente, 5 dias após a segunda inseminação.

No dia 5 após a segunda IA, o número de ovulações foi avaliado por laparoscopia. Os corpos lúteos foram classificados como normal ou com regressão prematura (RPCL), de acordo com o estado de desenvolvimento e a cor. As ovelhas com > 2 CL foram consideradas doadoras responsivas. Imediatamente depois, os embriões foram cirurgicamente recuperados sob anestesia geral.

As ovelhas, previamente privadas de comida e água por 24 h, receberam xilazina (0,10 mg/kg I.M.; Rompun[®], Bayer, Brasil) e cloridrato de cetamina (3,5 mg/kg por via intravenosa; Ketamina, Agener, Brasil). Além disso, foi administrada anestesia local na região da incisão cirúrgica (10 mL de lidocaína 2%; Lidovet[®], Bravet, Brasil). Os ovócitos/embriões foram coletados cirurgicamente após laparotomia ventral, através de uma incisão paramediana (5 cm de comprimento) cranial ao úbere, para acessar o trato reprodutivo. Cada corno uterino foi lavado com 60 mL de meio de recuperação de embriões (DPBS, Cultilab, Brasil), pré-aquecido a 38°C, e suplementado com 1% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). Resumidamente, o meio de lavagem foi injetado através de uma seringa estéril, com um cateter 20G inserido próximo da junção útero-tubária e recolhido através de uma sonda Foley n.8 ou n.10, que foi introduzida na bifurcação externa de cada corno uterino. Os embriões foram recuperados em uma placa de Petri, mantidos em meio holding (Holding plus, 0,4% de BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil), e examinados sob um estereomicroscópio (Olympus SZ; Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão) com 20 a 40 × de ampliação, seguindo os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Os embriões que desenvolveram a fases de blastocisto ou mórula foram classificados da seguinte forma: grau 1 (excelente ou bom), 2 (bom/regular), 3 (pobre), e 4 (mortos ou degenerados). Os embriões classificados com grau de 1 a 3 foram considerados transferíveis e aqueles de grau 1 e 2 foram consideradas como embriões congeláveis. Após a cirurgia, todos os animais receberam uma injeção I.M. de PGF2 α (250 μ g de cloprostenol) e o CIDR foi removido.

Os seguintes dados foram registrados para cada ovelha: número de corpo lúteo (CL), total de ovócitos/embriões recuperados (TOE), embriões viáveis (EV), embriões congeláveis (EC), embriões degenerados (EDG), e embriões totais (ET). A taxa de fertilização (TF) foi obtida dividindo ET por TOE; a taxa de degenerados (TDG) foi obtida dividindo EDG por ET; e a taxa de recuperação (TR) foi obtido dividindo TOE por CL.

4.5 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). No Experimento 1, os dados foliculares ovarianos foram comparados entre as três diferentes doses de E-17B através do modelo linear generalizado misto (procedimento GLIMMIX), e as médias dos quadrados mínimos foram ajustadas para comparações múltiplas, pelo teste Royen-Tukey-Kramer. A sincronia do tempo entre os tratamentos de E-17B para a emergência da próxima onda folicular foram comparados entre os grupos com o teste F (razão de variância) associados com a análise gráfica das distribuições de densidade. No Experimentos 2, a resposta ovariana e o rendimento embrionário foram comparados entre os tratamentos usando o procedimento GLIMMIX, com a média dos mínimos quadrados ajustados através do teste de Royen-Tukey-Kramer. Os dados registrados como porcentagens foram analisados pelos testes exato de Fisher or Qui-quadrado. O número de folículos pequenos ($1 \leq FP < 4\text{mm}$) e o diâmetro médio do maior folículo, entre os tratamentos, foram avaliados usando o teste t de Student. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão ou em porcentagem. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativos quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $0,05 < P < 0,10$.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

No momento da inserção do CIDR, 85,7% das ovelhas (18/21) tinham pelo menos um corpo lúteo, e as outras 14,3% (3/21) apresentaram um folículo com um diâmetro entre médio e grande (ou seja, ≥ 4 mm). As três doses diferentes de E-17 β foram capazes de causar supressão no maior folículo presente no ovário e sincronizar a emergência de uma nova onda folicular. Os perfis de diâmetros, padrão de regressão do maior folículo presentes durante o tratamento com E-17 β e o padrão de desenvolvimento do maior folículo da nova onda estão apresentados na Figura 2.

Os efeitos de diferentes doses de E-17 β sobre as características foliculares e lútea em ovelhas da raça Santa Inês, que receberam dispositivo intravaginal de progesterona, são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença entre o diâmetro do maior folículo no momento da inserção do CIDR, na administração do E-17 β e no fim da fase de crescimento da nova onda folicular; bem como o diâmetro do CL na inserção do CIDR. O intervalo médio entre tratamento de E-17 β para o surgimento da nova onda não diferiu entre os tratamentos (média global = $3,1 \pm 1,0$). No entanto, o dia da emergência folicular foi mais sincronizado na dose de 0,5 mg do que de 2,0 mg ($P \leq 0,05$) e indicou uma tendência a diferir da dose de 1,0 mg ($P = 0,079$). Não houve diferença no dia da regressão da nova onda entre as três doses de E-17 β utilizadas (média total = $6,5 \pm 1,2$). No entanto, o dia da regressão foi mais sincronizado com a dose de 0,5 mg do que 2,0 mg e 1,0 mg ($P < 0,05$). Os padrões de desenvolvimento folicular foram similares entre as ovelhas que foram tratados com as três doses de E-17 β . A taxa de crescimento, fase de crescimento, fase estática e o comprimento da onda não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$).

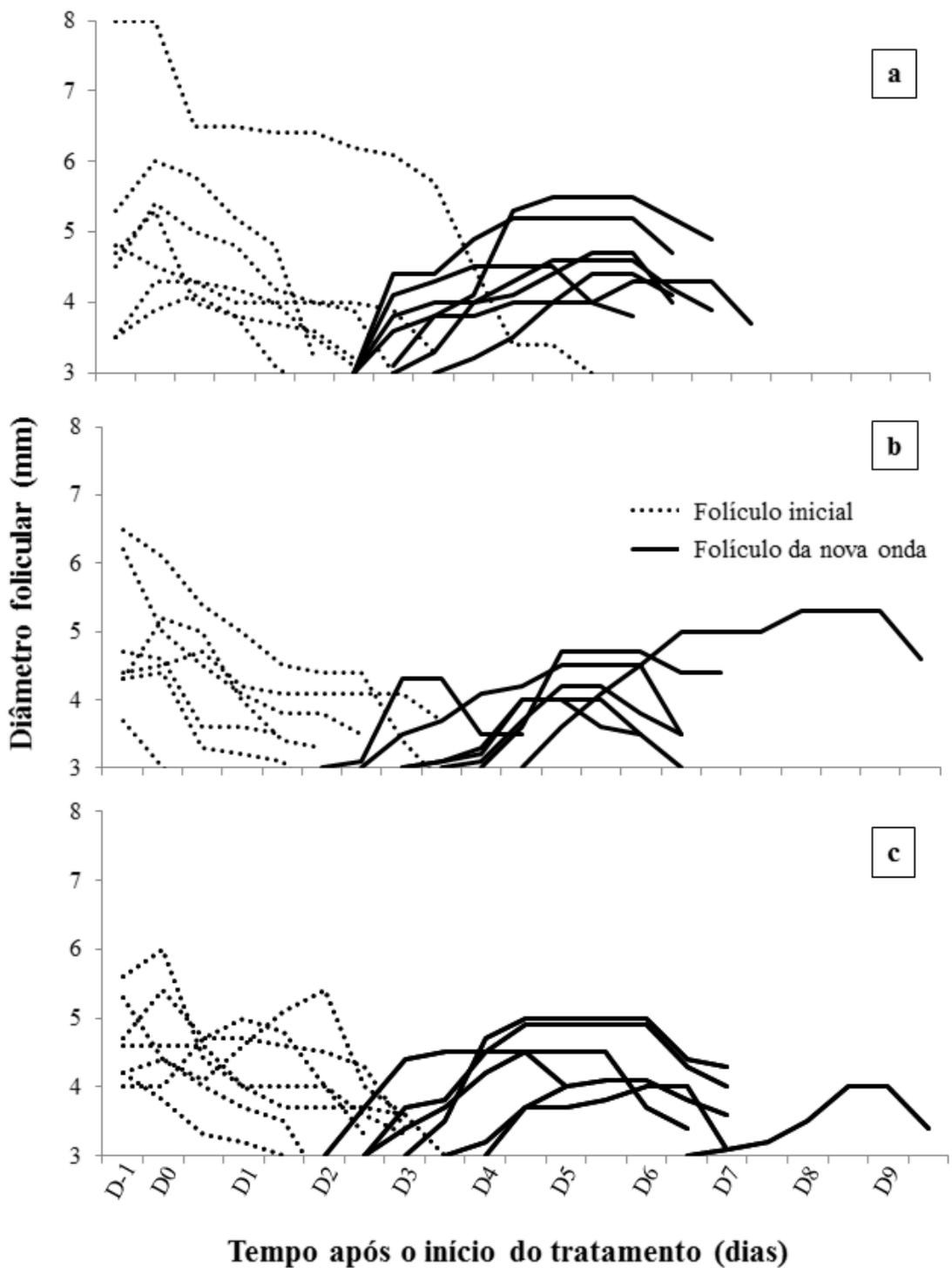


Figura 2. Perfil do diâmetro de estruturas ovarianas, identificadas individualmente (folículos ≥ 3 mm), presentes em cada ovelha ($n = 21$) durante cada protocolo de sincronização. A avaliação ultrassonográfica dos ovários teve início com a inserção do dispositivo de progesterona (dia -1) e durou até a constatação da regressão do folículo da nova onda recrutada. A linha tracejada representa o padrão de regressão do maior folículo presente no início do tratamento. A linha contínua representa o

padrão de emergência, crescimento e início da regressão do maior folículo da nova onda. O painel (a) representa 0,5 mg de E-17 β (n = 7); O painel (b) representa 1,0 mg de E-17 β (n = 7); e (C) representa 2,0 mg de E-17 β (n = 7).

Tabela 1. Características foliculares e luteais (Média \pm D.P.) em ovelhas da raça Santa Inês que receberam doses diferentes de estradiol-17 β (E-17 β) um dia após a inserção do dispositivo de progesterona

	estradiol-17 β			Total
	0,5 mg	1,0 mg	2,0 mg	
Número de ovelhas	7	7	7	21
Maior folículo (MF; mm)				
Inserção do CIDR	5,0 \pm 1,5	4,9 \pm 1,1	4,7 \pm 0,6	4,8 \pm 1,1
Administração de E-17 β	5,3 \pm 1,4	4,7 \pm 0,9	4,7 \pm 0,7	4,9 \pm 1,0
Nova onda	4,7 \pm 0,4	4,4 \pm 0,6	4,4 \pm 0,4	4,5 \pm 0,5
CL na administração de E-17 β (mm)	8,1 \pm 1,7 (6/7)	7,8 \pm 1,3 (6/7)	8,0 \pm 1,2 (6/7)	8,0 \pm 1,3 (18/21)
Dia da emergência da nova onda				
Média (\pm D.P.)	2,8 \pm 0,4	3,2 \pm 0,9	3,4 \pm 1,5	3,1 \pm 1,0
Amplitude	2,5 – 3,5	2,0 – 4,5	2,0 – 6,5	
Coeficiente de variação (%)	14 ^{a*}	28 ^{ab*}	44 ^b	
Dia da regressão da nova onda				
Média (\pm D.P.)	6,5 \pm 0,6	6,3 \pm 1,7	6,7 \pm 1,4	6,5 \pm 1,2
Amplitude	5,5 – 7,5	4,0 – 9,5	5,0 – 9,5	
Coeficiente de variação (%)	9 ^a	26 ^b	21 ^b	
Taxa de crescimento (mm/dia)	0,8 \pm 0,3	0,9 \pm 0,5	0,8 \pm 0,4	0,8 \pm 0,4
Fase de crescimento (dia)	2,4 \pm 0,6	1,8 \pm 0,9	1,9 \pm 0,2	2,0 \pm 0,7
Fase estática (dia)	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4
Duração da onda (dia)	3,7 \pm 0,4	3,1 \pm 1,1	3,3 \pm 0,4	3,4 \pm 0,7

^{a, b} Valores com letras diferentes entre linhas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) pelo teste F (razão de variância).

Valores com asterisco indicam tendência para significância estatística ($P = 0,079$) pelo teste F (razão de variância).

5.2 Experimento 2

Os efeitos do tratamento com E-17 β sobre a resposta ovariana e produção de embriões em ovelhas tratadas com progesterona estão mostrados na Tabela 2. Não houve diferença no número de ovelhas não responsivas entre os grupos com E-17 β e controle (19% vs 13%, respectivamente). A média geral de doadoras que responderam com > 2 CL foi de 85%. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos de ovelhas para qualquer uma das variáveis de produção de embriões analisados, com exceção da taxa de fertilização,

considerando apenas as ovelhas que não apresentaram RPCL, sendo 18% maior ($P < 0,0001$) nos animais do grupo controle do que nos animais tratados com E-17 β . (Tabela 2).

Tabela 2. Resposta ovariana e produção de embriões (Média \pm D.P.) após tratamento com múltiplas doses de pFSH em ovelhas da raça Santa Inês tratadas ou não com 0,5 mg de E-17 β , 24 h após a inserção do CIDR

	estradiol-17 β	Controle
Resposta das doadoras	n = 31	n = 31
Doadoras com > 2 CL (%)	25/31 (81)	27/31 (87)
Doadoras com RPCL (%)	5/31 (16)	10/31 (32)
Produção de embriões (doadoras sem RPCL)	n = 20	n = 17
Número de CL	9,8 \pm 4,8	12,0 \pm 8,2
Total ovócitos/embriões	8,4 \pm 4,4	8,2 \pm 4,5
Total de embriões	6,8 \pm 4,3	8,00 \pm 4,5
Embriões viáveis	5,2 \pm 4,3	6,5 \pm 4,2
Embriões congeláveis	4,2 \pm 4,0	5,9 \pm 4,5
Embriões degenerados (%)	31/135 (23)	25/136 (18)
Fertilização (%)	135/168 (80) ^b	136/139 (98) ^a
Produção de embriões (doadoras com/sem RPCL)	n = 25	n = 27
Número de CL	9,6 \pm 4,7	11,2 \pm 6,9
Total ovócitos/embriões	7,7 \pm 4,7	7,3 \pm 4,7
Total de embriões	6,1 \pm 4,4	6,1 \pm 4,6
Embriões viáveis	4,8 \pm 4,3	4,7 \pm 4,3
Embriões congeláveis	4,0 \pm 4,0	4,2 \pm 4,3
Embriões degenerados (%)	34/153 (22)	36/164 (22)
Fertilização (%)	153/193 (79)	164/198 (83)

^{a,b} Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$).

Entre os tratamentos, foi observada a ocorrência de RPCL em 16% (5/31; E-17 β) e 32% (10/31; controle) das ovelhas ($P > 0,05$). Em apenas 40% (6/15) das doadoras com RPCL foi recuperado embriões viáveis, enquanto que nas doadoras sem RPCL a recuperação de embriões ocorreu em 86% (32/37; $P < 0,01$) dos animais. Além disso, as doadoras com RPCL tiveram menor taxa de fertilização (55%, 46/84), quando comparado com as doadoras sem RPCL (88%, 271/307; $P < 0,0001$).

O número de folículos pequenos avaliados por ultrassonografia no dia 3 (15,9 \pm 3,8 vs 17,3 \pm 3,2) não diferiu entre os animais tratados com E-17 β ou controle, respectivamente. Contudo, o diâmetro médio do maior folículo (3,3 \pm 0,8 vs 4,6 \pm 1,0) e o percentual de ovelhas com folículos médios/grandes (2/12, 16,7% vs 10/12, 83,3%) foram significativamente inferiores nas fêmeas tratadas com E-17 β do que o grupo controle, respectivamente ($P < 0,01$; Figura 3).

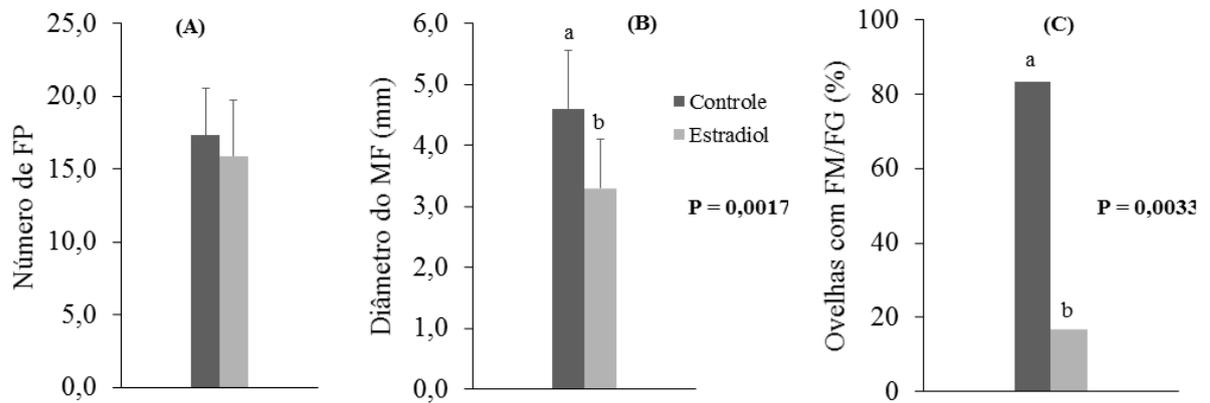


Figura 3. Características foliculares avaliadas por ultrassonografia no dia 3, em ovelhas do grupo E-17 β (barras cinza claras) e controle (barras cinza escuras). A: número de folículos pequenos ($1 \text{ mm} \leq \text{FP} < 4 \text{ mm}$; média \pm SD); B: diâmetro médio do maior folículo (média \pm SD); C: ovelhas com folículos médios/grandes (FM/FG $\geq 4 \text{ mm}$; percentual). Dentro dos pares de dados, barras com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes (P < 0,01).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente experimento confirmam os achados da nossa equipe, em que o tratamento de progesterona combinado com E-17 β em ovelhas cíclicas suprime o crescimento folicular e resulta na emergência de uma nova onda em um momento previsível. Todas as doses utilizadas de E-17 β causaram a atresia do maior folículo presente no início do tratamento e recrutamento de uma nova onda folicular (Figura 2). A administração de E2 associado a progesterona suprime as concentrações plasmáticas de gonadotrofinas em bovinos (Martinez et al., 2005) e ovinos (Barrett et al., 2008), sendo esse o principal efeito responsável pela regressão do folículo dominante.

A regressão do folículo dominante foi relacionada à um aumento das concentrações circulantes de E-17 β por pelo menos 12 h em ovelhas em anestro (Barrett et al., 2008) e em novilhas (Bo et al., 2000). Os últimos autores verificaram que a administração de 0,1 mg de E-17 β manteve altas concentrações de E2 por 10h, mas não foram suficientes para causar a regressão do folículo dominante. Como as concentrações circulantes de estradiol são dose-dependente (Bo et al., 2000; O'rourke et al., 2000) é provável que todas as doses de E-17 β do presente estudo tenham sido capazes de manter concentrações circulantes altas de E2 por um tempo igual ou superior a 12 h.

Os resultados do presente estudo mostraram que o intervalo entre o tratamento para a emergência da onda não diferiu entre as doses utilizadas de E-17 β , tendo uma média global de 3,1 dias (Tabela 1). A administração de 5,0 mg de E-17 β associado a progesterona em estágios aleatórios do crescimento folicular de novilhas, recruta uma nova onda de forma sincronizada entre 2,0 (Garcia & Salaheddine, 2001) e 3,4 dias (Martinez et al., 2000). Em ovelhas em anestro, uma dose menor do que as utilizadas neste estudo (0,35 mg de E-17 β e MAP) casou o recrutamento de uma nova onda mais tardiamente, aproximadamente 5 dias

(Barrett et al., 2008) e na estação reprodutiva não sincronizou a emergência da onda folicular (Bartlewski et al., 2015). É sabido que, após o fim do bloqueio das concentrações de gonadotrofinas provocado pelo E2 associado a progesterona, as concentrações de FSH voltam a subir, fazendo com que o mesmo atinja o pico que precede o recrutamento da onda folicular (Bo et al., 1994; Bo et al., 1995). É provável que a supressão da liberação de FSH provocada pelo E2 seja menor durante a estação reprodutiva em ovinos, necessitando de uma dose maior, como as que foram utilizadas neste estudo.

Nos diferentes grupos foi demonstrado um padrão semelhante do desenvolvimento folicular ovariano após a administração de E-17 β (Tabela 1), exceto para o dia da emergência e regressão da nova onda que foi mais sincronizado com a dose de 0,5 mg. De um total de 7 ovelhas tratadas com 0,5 mg de estradiol e progesterona (Experimento 1), o recrutamento da nova onda ocorreu nos dias 2,5 (4 ovelhas), 3,0 (2 ovelhas) e 3,5 (1 ovelha). Enquanto que nas doses de 1,0 e 2,0 mg de E-17 β a variação foi 2 a 4,5 dias e 2 a 6 dias, respectivamente. O motivo pelo qual o Grupo que recebeu a dose de 0,5 foi mais sincronizado não está claro, entretanto, concentrações altas de estradiol por um tempo prolongado leva a uma falta de sincronia e atraso na emergência da onda folicular, como pode ser observado na utilização de estradióis com meia-vida longa (Garcia & Salaheddine, 2001). Esse é um achado importante devido a uma preocupação crescente na redução hormonal dos protocolos empregados na reprodução animal.

A quantidade de folículos na emergência da onda folicular está positivamente correlacionada com a resposta superestimulatória após a administração de FSH (Mossa et al., 2007). O resultado do nosso estudo mostrou que no dia esperado para emergência folicular, dia 3 após a administração de 0,5 mg de E-17 β , o número de folículos pequenos foi semelhante em relação as ovelhas controle, que estavam em fase aleatória do crescimento folicular. Provavelmente o número de folículos pequenos presente no ovário seja mais dependentes de fatores intrínsecos de cada fêmea (Mossa et al., 2007), do que da fase do crescimento folicular.

Sabe-se que em bovinos, ocorre um aumento no número de pequenos folículos na emergência da onda folicular, enquanto que o estabelecimento da dominância reduz a população folicular presente nos ovários (Bungartz & Niemann, 1994; Ginther et al., 1996; Ferreira et al., 2004). Contrariamente em ovelhas cíclicas, o número de pequenos folículos (1-3 mm de diâmetro) não se altera ao longo do ciclo estral, não havendo evidência do efeito da dominância folicular sobre a quantidade desses folículos (Duggavathi et al., 2003). Aparentemente um grupo de folículos de 1 a 3 mm permanece constante durante o ciclo estral

da ovelha, e tais folículos são capazes de iniciar uma onda após a administração exógena de doses suprafisiológicas de FSH.

Vários trabalhos apoiam a ideia de que o tratamento superestimulatório iniciado na ausência de folículo dominante, em ovinos, resulta em aumento do rendimento embrionário final (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Veiga-Lopez et al., 2005; Veiga-Lopez, Encinas, et al., 2008; Menchaca et al., 2010). Contrariamente ao esperado, no presente trabalho, o tamanho folicular (E-17 β 3,3 \pm 0,8 vs Controle 4,6 \pm 1,0; P < 0,01; Figura 3) no início da superestimulação com FSH, não afetou a taxa de ovulação e o rendimento embrionário. Nas avaliações ultrassonográficas verificou-se um provável efeito supressor do maior folículo sobre os outros folículos da mesma onda, concordando com estudos prévios (Veiga-Lopez et al., 2005; Veiga-Lopez, Dominguez, et al., 2008). Contudo, acreditamos que esse efeito seja pequeno, pois não é raro que mais de um folículo atinja tamanhos pré-ovulatórios e que ocorra mais de uma ovulação de folículos da mesma onda. Além disso, fisiologicamente também pode ocorrer ovulação de folículos de múltiplas ondas (Seekallu et al., 2010; Toosi et al., 2010). Em ovelhas submetidas a ovariectomia unilateral ocorre um aumento de ovulações dos folículos da penúltima onda, tendo um efeito compensatório na taxa de ovulações (Duggavathi et al., 2008). Tudo isso vai ao encontro da possibilidade de que a presença de um folículo grande no início do tratamento superestimulatório tem pouco ou nenhum efeito sobre o rendimento embrionário final.

A RPCL é um problema inerente a superovulação de ovinos, que normalmente resulta em recuperação de embriões de baixa qualidade ou mesmo nenhuma recuperação (Schiewe et al., 1991; Cognie, 1999). Na tentativa de contornar esse efeito, todas as ovelhas doadoras deste experimento tiveram um CIDR de segundo uso introduzido após a IA. Entretanto, essa abordagem não impediu o aparecimento de RPCL nos dois grupos (16% Grupo E-17 β vs 32% grupo controle). Apesar de um efeito negativo da RPCL, foi possível a recuperação de embriões viáveis em 40% dos animais e a obtenção de 55% na taxa de fertilização nessas doadoras. Não houve intenção em avaliar o efeito da adição do CIDR de segundo uso após a inseminação sobre a melhora no rendimento embrionário em ovelhas com RPCL, entretanto, os achados do presente estudo levam a crer que isso possa acontecer.

Nenhum dos parâmetros de produção embrionária foi afetado pelos tratamentos, exceto a taxa de fertilização das doadoras sem RPCL, sendo esta, maior no grupo controle (Tabela 2). Isso é difícil de ser explicado, pois esperava-se que ocorresse uma melhora no rendimento embrionário com a superestimulação iniciada na emergência da onda folicular. No entanto, Veiga-Lopes et al. (2005) relataram que uma maior quantidade de folículos de tamanho

pequeno, isto é 2 mm, no início da superestimulação, foi positivamente correlacionada com a taxa de embriões degenerados. Esses autores sugeriram que, neste caso, a capacidade de desenvolvimento folicular pudesse estar comprometida. No presente experimento, é possível que a alteração na fertilização também esteja relacionada à superestimulação de folículos muito pequenos.

Em resumo, todas as doses de E-17 β usadas neste estudo causaram a regressão do maior folículo e emergência de uma nova onda em um momento previsível. Contudo, a administração de 0,5 mg E-17 β foi mais eficiente na sincronia da emergência da onda folicular. Esses resultados levam a convicção de que a superestimulação com pFSH iniciada no tempo previsto para emergência da onda folicular não melhora a resposta superovulatória e a produção de embriões. Conclui-se que a associação de E-17 β e progesterona para induzir a regressão do folículo dominante e sincronizar a emergência da onda são desnecessários em programas de superovulação ovina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.

BARRETT, D. M. W. et al. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, Apr 2008.

BARTLEWSKI, P. et al. Ovarian responses, hormonal profiles and embryo yields in anoestrous ewes superovulated with Folltropin (R)-V after pretreatment with medroxyprogesterone acetate-releasing vaginal sponges and a single dose of oestradiol-17 beta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 3, p. 299-307, Jun 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; ALEXANDER, B. D.; KING, W. A. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 210-216, Mar 2008.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 111-124, Jan 1999.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 130-143, Jul 2016.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Comparison of the effects of pretreatment with Veramix sponge (medroxyprogesterone acetate) or CIDR (natural progesterone) in combination with an injection of estradiol-17 beta on ovarian activity, endocrine profiles, and embryo yields in cyclic ewes superovulated in the multiple-dose Folltropin-V (porcine FSH) regimen. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1225-1237, Oct 2015.

BO, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204, Aug 1995.

BO, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17-beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, Jun 1994.

BO, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, Jan 2002.

BO, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 3-4, p. 141-157, May 2000.

BRASIL, O. O. et al. Superovulatory and embryo yielding in sheep using increased exposure time to progesterone associated with a GnRH agonist. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 54-58, Mar 2016.

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy-cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 3, p. 583-591, Aug 1994.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. ANIMAL, C. B. D. R. Belo Horizonte: CBRA 2013.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 105-116, Jan 1999.

COGNIE, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 171-188, Jan 2003.

DUGGAVATHI, R. et al. Short- and long-term effects of unilateral ovariectomy in sheep: Causative mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 3, p. 490-496, Mar 2008.

DUGGAVATHI, R. et al. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 495-510, Aug 2003.

FERREIRA, A.M. et al. População folicular ovariana durante o ciclo estral em vacas da raça Gir Ovarian follicular population during estrous cycle in Gir breed (*Bos indicus*) cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1689-1694, 2004.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, Germany, v. 36, n. 6, p. 301-307, 2001.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, Dec 1996.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 421-435, 2004.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. **Theriogenology**, v. 54, n. 7, p. 1055-1064, Oct 2000.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology**, v. 57, n. 4, p. 1263-1272, Mar 2002.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 6, p. 601-611, Nov-Dec 2002.

MARTINEZ, M. F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-769, Sep 2000.

MARTINEZ, M. F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, Mar 2005.

MENCHACA, A. et al. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 113-118, 2010.

MOSSA, F. et al. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3-4, p. 391-396, Aug 2007.

O'ROURKE, M. et al. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1-2, p. 1-12, Apr 2000.

RUBIANES, E. et al. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 465-472, Jan 1995.

SCHIEWE, M. C. et al. Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin-f2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 19-30, Sep 1991.

SEEKALLU, S. V. et al. Effects of estradiol and progesterone on circulating LH and FSH secretion, and ovarian antral follicle growth in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 91, n. 2-3, p. 178-185, Jul 2010.

THOMPSON, J.; MEYER, H. Body condition scoring of sheep. Corvallis, Oregon 1994. Disponível em: <<http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/14303/ec1433.pdf>>. Acesso em: 03 May.

TOOSI, B. M. et al. 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, n. 9, p. 1192-1201, Jun 2010.

VEIGA-LOPEZ, A.; DOMINGUEZ, V. et al. Features of follicle-stimulating hormone-stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 1328-1337, May 2008.

VEIGA-LOPEZ, A., ENCINAS, T. et al. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 1, p. 92-98, Feb 2008.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1973-1983, Apr 2005.

VINOLES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 1-2, p. 69-79, Jan 2004.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO OVARIANA COMO FERRAMENTA PARA SELEÇÃO DE OVELHAS DOADORAS EM PROGRAMAS DE SUPEROVULAÇÃO

1 RESUMO

Atualmente, existe uma grande variabilidade na resposta superovulatória de ovelhas doadoras de embriões, essa variação é muito influenciada por fatores intrínsecos, podendo estar fortemente relacionado as características do ovário. Portanto, avaliou-se, em diferentes fases do ciclo estral, se o diâmetro ovariano e a quantidade de folículos ≥ 2 mm poderiam servir como parâmetros de referência para seleção das doadoras mais responsivas a superestimulação ovariana. A avaliação do número de folículos no metaestro foi o melhor parâmetro para a seleção das ovelhas doadoras de embriões. Essa abordagem é de fácil execução e pode ser incorporado aos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões para reduzir a inconsistência dos resultados.

Palavras chave: embriões, Santa Inês, tamanho ovariano, folículo, ultrassonografia

2 ABSTRACT

Nowadays, there is a great variability in the superovulatory response of donors' embryos sheep, this variation is very influenced by intrinsic factors, being able to be strongly related the characteristics of the ovary. Therefore, at different stages of the estrous cycle, it was evaluated whether ovarian diameter and follicle size ≥ 2 mm could serve as reference parameters for selecting the most responsive donors for ovarian superstimulation. The evaluation of the follicles number in the metestrus was the best parameter for the selection of embryo donor ewes. This approach is easy to implement and can be incorporated into multiple ovulation and embryo transfer programs to reduce of results inconsistency.

Keywords: Embryos, Santa Inês, ovarian size, follicle, ultrasound

3 INTRODUÇÃO

As tecnologias de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) são aplicadas em ovinos para aumentar a progênie de ovelhas selecionadas e para a conservação de embriões em bancos de germoplasma. Tradicionalmente, a tecnologia de MOTE consiste na sincronização do estro com progesterona/progestágeno por 12 ou 14 dias e a administração de doses suprafisiológicas de gonadotrofinas para induzir o crescimento e ovulação de muitos folículos ovarianos (Cognie, 1999; Cognie & Baril, 2002; Brasil et al., 2014). Após o tratamento hormonal, os embriões são recuperados do trato reprodutivo de forma cirúrgica, seguido pela transferência desses para fêmeas receptoras ou criopreservação.

O sucesso de um programa MOTE é determinado por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo a estação, a genética, a idade, a nutrição, o manejo, o estresse, o tipo de gonadotrofinas e os protocolos de tratamento adotados (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Apesar de ultimamente ter-se um maior controle dos fatores extrínsecos, a resposta ovariana ainda continua variável, sugerindo que os fatores intrínsecos são os principais responsáveis por essa variabilidade.

Muitos estudos mostraram que a resposta ovariana está relacionada com as características do ovário, no início da superestimulação com gonadotrofinas exógenas (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Veiga-Lopez et al., 2005; Mossa et al., 2007; Bartlewski et al., 2008). A maioria desses estudos aponta que o número de pequenos folículos está positivamente correlacionado com a taxa de ovulação e com o número de embriões viáveis (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Mossa et al., 2007).

Em bovinos, o peso e o volume do ovário são correlacionados com a população folicular (Murasawa et al., 2005), e em cada onda folicular pode existir uma variação de até sete vezes no número de folículos pequenos entre indivíduos (Burns et al., 2005). Em ovinos,

verificou-se uma elevada repetibilidade intraindividual após sucessivos tratamentos de superovulação (Cordeiro et al., 2003; Bruno-Galarraga et al., 2014). Isso possivelmente está relacionado à população folicular intrínseca a cada fêmea (isto é, a reserva folicular), e conseqüentemente, com o desenvolvimento folicular.

As dimensões da área de tecido ovariano, avaliadas por ultrassonografia, são indicadores, não invasivos, das reservas foliculares ovariana (Bowen et al., 2007) e do potencial sucesso das tecnologias de reprodução assistida aplicada a mulheres (Lass et al., 1997; Syrop et al., 1999), entretanto tais estudos não foram realizados em ovinos.

A criação de uma metodologia para pré-seleção de ovelhas, com alta capacidade de responder a superestimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, permitiria a redução de custos com protocolos hormonais e evitaria procedimentos cirúrgicos desnecessários em doadoras não responsivas. Portanto, objetivou-se avaliar se as medidas ovarianas bidimensionais e a população folicular em diferentes fases do ciclo estral estão correlacionadas com a resposta superovulatória e rendimento embrionário em ovinos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estação experimental e animais

O estudo foi realizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia localizada em Brasília (região Centro-Oeste do Brasil) a 15°52' de latitude S e altitude variando 1050-1250 m acima do nível do mar. Essa região apresenta um clima tropical chuvoso, com invernos secos e verões chuvosos, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal.

Cinquenta e sete ovelhas da raça Santa Inês, sexualmente maduras, clinicamente saudáveis, com idade entre 2 a 5 anos e escore de condição corporal $> 2,5$ (intervalo 1-5; (Thompson & Meyer, 1994), foram utilizadas neste estudo. Todas as ovelhas foram mantidas em baias de confinamento e alimentados com feno de Tifton e ração balanceada (150 g/ovelha/dia), com acesso ilimitado à água e sal mineral.

4.2 Procedimento experimental

Todas as ovelhas tiveram o estro sincronizado pela administração de duas doses de 75 µg de d-cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, ARSA S. R. L., Argentina) com 10 dias de intervalo entre as aplicações (Godfrey et al., 1997). Após a última injeção de d-cloprostenol (dia 0), nos dias 2,5, 4,5 e 9,5, tempo correspondente ao pró-estro/estro, metaestro e diestro, respectivamente, foram realizados exames ultrassonográficos para avaliação das medidas ovarianas e quantificação dos folículos ≥ 2 milímetros.

O tamanho do ovário foi calculado usando a fórmula bidimensional validada para mulheres por Frattarelli et al. (2002), através dos maiores diâmetros do plano sagital de cada ovário $[(D1 + D2) / 2]$ e feito a média para cada ovelha (Figura 1). Os animais deste experimento foram submetidos ao procedimento de superovulação 10 dias após a última avaliação ultrassonográfica dos ovários. O número de folículos e o tamanho bidimensional do ovário nas fases de pró-estro/estro, metaestro e diestro, foram avaliados quanto a sua correlação com as variáveis de superovulação e rendimento embrionário.

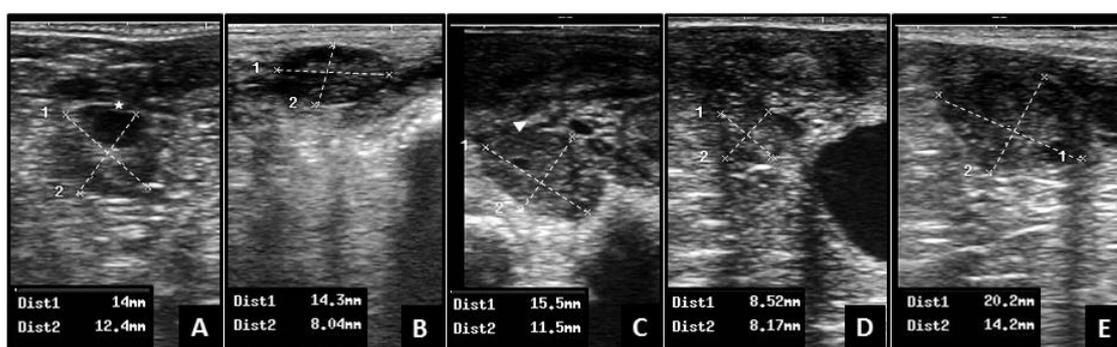


Figura 1. Imagem ultrassonográfica dos dois maiores diâmetros do plano sagital do ovário em diferentes fases do ciclo estral. Pró-estro/estro (A) com a presença de um folículo grande (estrela); metaestro (B); diestro (C) com a presença de um corpo lúteo (seta); ovário pequeno (D); e ovário grande (E).

4.3 Avaliação ultrassonográfica

A avaliação dos ovários foi realizada por um operador experiente utilizando ultrassonografia transretal com alta resolução, com equipamento de ultrassom modo B em tempo real (DP-2200Vet; Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., Nanshan, Shenzhen, PR China), equipado com um transdutor linear multifrequencial na frequência 7,5 MHz e adaptado com um cano enrijecido. As ovelhas foram submetidas a exame de ultrassom, enquanto contidas na posição de estação em um tronco de contenção. Esta técnica foi validada para o monitoramento da dinâmica folicular ovariana e detecção de CL em ovinos (Vinoles et al., 2004).

4.4 Protocolo de superovulação e coleta de embriões

As ovelhas foram sincronizadas (4 ou 6 ovelhas/dia) com a inserção (dia 0) de um CIDR por 7 dias. No dia 4, a superestimulação foi induzida com aplicação de 133 mg de pFSH I.M. (Folltropin[®]-V, Tecnopec, AHC Inc., Bioniche, Canada) em oito doses decrescentes (20% x 2; 15% x 2; 10% x 2; 5% x 2) administradas duas vezes ao dia, iniciada na manhã do dia 4 e finalizada 12 horas após a retirada do CIDR. Uma dose de PGF2 α (250 μ g de cloprostenol; Sincrocio[®], Ouro Fino Saúde animal LTDA, Brasil) e de GnRH (25 μ g de acetato de gonadorelina; Gestran Plus, Tecnopec, ARSA SRL, Argentina) foi administrada I.M. junto com a 5 e 8 a injeção de pFSH, respectivamente.

Todas as fêmeas foram inseminadas as 36 e 48 h após a remoção do CIDR, utilizando 0,5 mL de sêmen fresco, previamente coletado de três carneiros, agrupado e mantido em banho-maria a 33°C. No quinto dia após a segunda IA, o número de ovulações foi verificado por procedimento laparoscópico. As ovelhas com < 3 CL foram consideradas como fêmeas não responsivas e não foram coletadas.

As doadoras superovuladas foram anestesiadas com xilazina (0,10 mg/kg I.M.; Rompun[®], Bayer, Brasil) e cloridrato de cetamina (3,5 mg/kg por via intravenosa; Ketamina, Agener, Brasil). Além disso, foi administrada anestesia local na região da incisão cirúrgica (10 mL de lidocaína; Lidovet[®], Bravet, Brasil). Os ovócitos/embriões foram coletados cirurgicamente após laparotomia ventral, através de uma incisão paramediana (5 cm de comprimento) cranial ao úbere, para acessar o trato reprodutivo. Cada corno uterino foi lavado com 60 mL de meio de recuperação de embriões (DPBS, Cultilab, Brasil), pré-aquecido a 38°C, e suplementado com 1% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). Os embriões foram recuperados em uma placa de Petri, mantidos em meio holding (Holding plus, 0,4% de BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil), e examinados sob um estereomicroscópio (Olympus SZ; Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão) com 20 a 40 \times de ampliação, seguindo os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Os embriões que desenvolveram a fases de blastocisto ou mórula foram classificados da seguinte forma: grau 1 (excelente ou bom), 2 (bom/regular), 3 (pobre), e 4 (mortos ou degenerados). Os embriões classificados com grau de 1 a 3 foram considerados viáveis.

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), com diferenças consideradas significativas quando o $P \leq 0,05$. O tipo de distribuição das variáveis foi avaliado utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit. A quantidade de folículos e o diâmetro do ovário foram avaliados no tempo correspondente ao pró-estro/estro, metaestro e diestro. A partir dessa análise, as ovelhas, nas diferentes fases, foram classificadas como de alta população folicular (≥ 7 folículos) e de baixa população folicular (< 7 folículos), de acordo com a média do número de folículos. Posteriormente, foi analisada a resposta superovulatória das doadoras. Todos os dados foram analisados utilizando o modelo linear generalizado misto (procedimento GLIMMIX), com distribuição exponencial das variáveis, e as médias dos mínimos quadrados ajustadas para comparações múltiplas, pelo teste Royen-Tukey-Kramer. Além disso, correlações de Spearman foram realizadas entre os parâmetros de avaliação ovariana e a resposta superovulatória e de produção de embriões das doadoras.

5 RESULTADOS

Os dias 2,5, 4,5 e 9,5 após a administração da segunda aplicação de PGF foram bem representativos das fases de pró-estro/estro, metaestro e diestro, respectivamente. No dia correspondente ao pró-estro/estro 84% (48/57) das ovelhas tinham pelo menos um folículo \geq 4,5 mm. No dia correspondente ao metaestro, 10% (6/57) dos animais apresentaram CL identificável, enquanto que no tempo correspondente ao diestro, 89% (51/57) das ovelhas apresentaram CL bem desenvolvido.

A média da população de folículos (≥ 2 mm) e as dimensões dos ovários foram semelhantes entre todas as fases avaliadas, tendo média geral de $6,7 \pm 3,2$ (intervalo: 0-15 folículos; $P > 0,05$) e $12,3 \pm 1,7$ mm de diâmetro (intervalo: 8,72-18,8 mm; $P > 0,05$), respectivamente. Houve correlação positiva, com diferentes níveis de significância, entre os parâmetros ovarianos utilizados nas diferentes fases do ciclo estral, exceto entre a quantidade de folículos no metaestro e o número de folículos no diestro e entre a quantidade de folículos no pró-estro/estro e o diâmetro ovariano no metaestro (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação (valor r) entre os parâmetros ovarianos, avaliados em diferentes fases do ciclo estral, utilizados para pré-seleção de ovelhas doadoras de embriões

	FP/E	FM	FD	DP/E	DM
FM	0,37**				
FD	0,47***	0,23			
DP/E	0,29*	0,37**	0,43***		
DM	0,20	0,39**	0,42**	0,76***	
DD	0,30*	0,35**	0,50***	0,72***	0,76***

Asteriscos indicam correlações significativas: * $P > 0,01$ a $0,05$; ** $P > 0,001$ a $0,01$; *** $P < 0,001$.

Quantidade de folículos no pró-estro/estro (FP/E), metaestro (FM) e diestro (FD).

Dimensão ovariana no pró-estro/estro (DP/E), metaestro (DM) e diestro (DD).

A quantidade de folículos no diestro e as dimensões ovarianas não foram correlacionadas com as variáveis relacionadas ao protocolo de superovulação. Contudo, a resposta superovulatória e rendimento de ovócitos e embriões foram positivamente correlacionadas com a quantidades de folículos no metaestro. Na quantidade de folículos no pró-estro/estro, somente o total de ovulações não apresentou correlação significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação (valor r) entre a quantidade de folículos e as dimensões ovarianas em diferentes fases do ciclo estral com a resposta superovulatória e rendimento de embriões das ovelhas doadoras

Resposta das ovelhas doadoras	Quantidade de folículos ¹			Dimensão ovariana ²		
	FP/E	FM	FD	DP/E	DM	DD
Total de ovulações	0,22	0,28*	0,08	0,25	0,05	0,07
Total de estruturas	0,34*	0,39**	0,15	0,24	0,08	0,11
Total de embriões	0,40**	0,46***	0,10	0,21	0,11	0,10
Embriões viáveis	0,36**	0,40**	0,11	0,18	0,06	0,05

Asteriscos indicam correlações significativas: * P 0,01 a 0,05; ** P 0,001 a 0,01; *** P < 0,001.

¹ Quantidade de folículos no pró-estro/estro (FP/E), metaestro (FM) e diestro (FD).

² Dimensão ovariana no pró-estro/estro (DP/E), metaestro (DM) e diestro (DD).

Quando os dados de superovulação foram comparados com os da quantidade de folículos nas diferentes fases do ciclo estral, houve um aumento no número de ovulações, estruturas (ovócitos e embriões), embriões totais e embriões viáveis ($P < 0,05$; Tabela 3) em animais com alta população folicular (≥ 7 folículos) no metaestro. Enquanto que houve um aumento apenas no total de embriões em ovelhas com alta quantidade de folículos no pró-estro/estro, e nenhuma diferença entre o grupo de alta e baixa população folicular no diestro (Tabela 3).

Tabela 3. Resposta ovariana e produção embrionária (média \pm desvio padrão) em ovelhas com alta (≥ 7) ou baixa (< 7) quantidade de folículos, em diferentes fases do ciclo estral, submetidas ao protocolo de superovulação

Quantidade de folículos		Ovulações	Estruturas	Embriões	Embriões viáveis
Pró-estro/estro	n				
Alto ¹	30	9,5 \pm 7,0	6,9 \pm 4,9	6,2 \pm 4,8 ^a	4,9 \pm 4,4
Baixo ²	27	7,6 \pm 5,2	4,9 \pm 5,1	3,6 \pm 4,1 ^b	3,0 \pm 4,1
Metaestro	n				
Alto	33	10,9 \pm 7,2 ^c	8,2 \pm 4,8 ^c	7,0 \pm 4,6 ^c	5,4 \pm 4,3 ^c
Baixo	24	6,1 \pm 4,4 ^d	3,4 \pm 4,3 ^d	2,6 \pm 3,8 ^d	2,1 \pm 3,8 ^d
Diestro	n				
Alto	25	9,8 \pm 7,9	7,5 \pm 5,5	6,3 \pm 5,5	4,8 \pm 4,8
Baixo	32	8,2 \pm 5,3	6,3 \pm 4,5	4,3 \pm 4,0	3,4 \pm 4,0

^{a,b} Em cada fase do ciclo estral, letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas (P <0,05).

^{c,d} Em cada fase do ciclo estral, letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas (P <0,01).

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo suportam a ideia de que uma simples análise ultrassonográfica pode ser usada para prever a capacidade de resposta aos tratamentos superovulatório de ovelhas doadoras de embriões. Embora o diâmetro ovariano não tenha sido um indicador, a quantificação da população folicular ≥ 2 mm pode ser utilizada antes da superestimulação com FSH para selecionar as fêmeas potencialmente mais responsivas ao protocolo.

No presente estudo, houve uma elevada variabilidade interindividual no número de folículos (intervalo: 0-15), assim como o reportado por outros autores (Mossa et al., 2007; Bruno-Galarraga et al., 2014). A razão para essa variabilidade ainda é desconhecida, contudo fatores genéticos podem ser os principais responsáveis pela variação entre os indivíduos (Bindon et al., 1986; Monget et al., 2002). Em bovinos (Rico et al., 2009; Guerreiro et al., 2014), caprinos (Monniaux et al., 2011), ovinos (Lahoz et al., 2014) e humanos (Visser et al., 2006) a variação no número de pequenos folículos responsivos a gonadotrofina pode ser explicada pelos níveis de produção do hormônio anti-Mülleriano. Além desse hormônio, os níveis plasmáticos de inibina A, apresenta uma alta correlação positiva com o número de folículos (Veiga-Lopez et al., 2008) e com o número de corpos lúteos e embriões recuperados (Gonzalez-Bulnes et al., 2002) em ovelhas superovuladas.

Uma elevada repetibilidade intraindividual no número de folículos ocorre entre as ondas foliculares em bovinos (Singh et al., 2004; Burns et al., 2005). Por outro lado, em ovinos o número de pequenos folículos (1-3 mm de diâmetro) é praticamente constante durante todo o ciclo estral (Duggavathi et al., 2003). No presente estudo, apesar de ter sido observado correlações positivas no número de folículos entre algumas das fases estudadas, essas correlações não foram altas (Tabela 1). Segundo Scaramuzzi et al. (2011) a população de folículos responsivos a gonadotrofinas apresenta pequena mudança numérica ao longo do ciclo,

ao contrário dos folículos dependentes de gonadotrofinas que crescem em padrão de ondas. Com base nesses achados, para a obtenção de uma maior repetibilidade entre as fases estudadas, a quantificação de todos os folículos ≥ 1 mm seria necessária, contudo, devido à complexidade para analisar tais folículos, este método torna-se pouco prático para ser executado em condições de campo.

O número de pequenos folículos, avaliados na primeira administração de FSH, é positivamente correlacionado com a taxa de ovulação e com o número de embriões viáveis em muitos estudos (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Mossa et al., 2007). No entanto, outros autores não verificaram essa correlação (Bruno-Galarraga et al., 2014). Neste estudo, a resposta superovulatória e produção de embriões foi positivamente correlacionada com o número de folículos ≥ 2 mm no metaestro. Enquanto que no pró-estro/estro houve correlação positiva apenas com os parâmetros de rendimento de ovócitos e embriões e no diestro não houve correlação com nenhuma das variáveis analisadas. Esses resultados indicam que a avaliação da população de folículos ≥ 2 mm só tem valor como uma ferramenta para a pré-seleção de doadoras em apenas algumas fases do ciclo estral. Quando os animais foram divididos em alta e baixa população folicular os resultados da resposta superovulatória e rendimento embrionário confirmaram as correlações observadas em cada fase estudada (Tabela 3), indicando que a quantificação dos folículos no metaestro, isto é, 4,5 dias após a segunda aplicação de PGF, é a melhor fase para a seleção de doadoras.

As fases de pró-estro/estro e metaestro corresponderam aos dias 2,5 e 4,5 após a segunda aplicação de PGF, respectivamente. Esses dias são próximos ao dia em que ocorre a ovulação em protocolos com prostaglandinas (Fierro et al., 2013), sendo que, no dia da ovulação também ocorre a emergência da primeira onda folicular (Bartlewski et al., 1999; Toosi et al., 2010). Portanto, parece que a avaliação do número de folículos ≥ 2 mm tem maior correlação com os parâmetros superovulatório e de rendimento de embriões, quando a mesma é realizada mais próximo da emergência da onda folicular. Uma possível alternativa para quantificar os folículos ≥ 2 mm em um momento mais previsível da emergência da onda folicular, seria a utilização do protocolo de progesterona associado a aplicação de 0,5mg de benzoato de estradiol (BE), que permite o recrutamento da onda de forma sincronizada em 4 dias após a administração do BE (Brasil et al., 2016).

O diâmetro ovariano teve uma elevada variabilidade interindividual. Em nosso conhecimento, este é o primeiro relato em ovinos que tenta demonstrar a relação entre o diâmetro do ovário, avaliado por ultrassonografia, e a capacidade de resposta ovariana as gonadotrofinas. A hipótese que assim como em mulheres (Lass et al., 1997; Syrop et al., 1999)

as avaliações das dimensões ovarianas por ultrassonografia seria um bom indicador para prever a capacidade de resposta das fêmeas aos tratamentos de superestimulação, não foi confirmado neste estudo (Tabela 2).

A repetibilidade intraindividual do diâmetro ovariano, nas fases do ciclo estral estudadas, foi elevada ($r = 0,72$ e $0,76$; Tabela 1). Esse achado permite inferir que a ultrassonografia transretal é um método confiável para avaliar as dimensões do ovário nas diferentes fases do ciclo estral. Contudo, é importante ressaltar, que no diestro o tamanho do corpo lúteo pode interferir na mensuração do ovário, principalmente quando este é muito protuso. Portanto, para a formação de uma imagem mais representativa do ovário, deve-se delimitar o parênquima ovariano com a menor interferência possível do corpo lúteo.

As ovelhas com os menores diâmetro do ovário (8,7 a 10,5 mm) tiveram entre 0 a 13 ovulações, enquanto que as de maiores diâmetros (14 a 18 mm) tiveram entre 2 a 25 ovulações. É coerente pensar que ovelhas que possuem uma alta taxa de ovulação necessitem de uma maior dimensão ovariana para o desenvolvimento de muitos corpos lúteos, porém em ovelhas que apresentam um menor diâmetro de ovário, é possível que exista um mecanismo compensatório responsável pela redução do tamanho do CL, comportando boas taxas de ovulações (10 a 13 CL).

No presente estudo, houve correlação positiva entre a quantidade de folículo com o tamanho do ovário. Contudo, o tamanho do ovário não foi correlacionado com o número de ovulações. Seguindo um pensamento lógico, um maior número de folículos necessita de um tamanho de ovário maior, enquanto que, um maior tamanho de ovário não necessariamente apresentará sempre um maior número de folículos. Neste caso, o ovário pode apresentar muitas áreas de tecido cortical desprovida de folículos, sendo essas regiões negativamente correlacionadas com o número de folículos pré-antrais e antrais, bem como estão relacionadas à uma baixa resposta superovulatória (Cushman et al., 1999).

Em resumo, a avaliação ultrassonográfica do número dos folículos ≥ 2 mm, realizada 4,5 dias após pré-tratamento de sincronização com prostaglandina, é um teste simples que pode ser utilizado para a seleção das ovelhas doadoras de embriões. Essa abordagem pode ser associada a outras metodologias de triagem, incluindo dosagens de hormônios (Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Fuerst et al., 2009; Lahoz et al., 2014) e informações de tratamentos prévios de superovulação (Bruno-Galarraga et al., 2014; Balaro et al., 2016). A avaliação ultrassonográfica das dimensões ovarianas, embora apresente alta repetibilidade entre as avaliações, não demonstra eficácia como um método de seleção de ovelhas doadoras de embriões.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.

BALARO, M. F. A. et al. Pre-Selection Test to Identify High Responder Donor Goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 386-391, Jun 2016.

BARTLEWSKI, P. M.; ALEXANDER, B. D.; KING, W. A. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 210-216, Mar 2008.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 111-124, Jan 1999.

BINDON, B. M. et al. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 53-70, Jan 1986.

BOWEN, S. et al. Simple tools for assessment of ovarian reserve (OR): individual ovarian dimensions are reliable predictors of OR. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 2, p. 390-395, Aug 2007.

BRASIL, O. O. et al. Efeito de uma baixa dose de benzoato de estradiol sobre a dinâmica folicular ovariana em ovinos. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2016, Curitiba, Brasil. **Anais...** Curitiba, 2016.

BRASIL, O. O.; MOREIRA, N. H.; RAMOS, A. F. Situação atual da superovulação em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 147-153, 2014.

BRUNO-GALARRAGA, M. M. et al. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 84-89, Jul 2014.

BURNS, D. S. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62, Jul 2005.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 105-116, Jan 1999.

COGNIE, Y.; BARIL, G. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Productions Animales**, v. 15, n. 3, p. 199-207, Jul 2002.

CORDEIRO, M. F. et al. Embryo recovery rate in Santa Ines ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 1, p. 19-23, Jul 2003.

CUSHMAN, R. A. et al. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 349-354, Feb 1999.

DUGGAVATHI, R. et al. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 495-510, Aug 2003.

FIERRO, S. et al. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 399-408, Feb 2013.

FRATTARELLI, J. L.; LEVI, A. J.; MILLER, B. T. A prospective novel method of determining ovarian size during in vitro fertilization cycles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 19, n. 1, p. 39-41, Jan 2002.

FUERST, K. J.; BARTLEWSKI, P. M.; KING, W. A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v. 82, n. 2-3, p. 144-148, Apr 2009.

GODFREY, R. W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of oestrus synchronisation of hair sheep in the tropic. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 99-106, 1997.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 421-435, 2004.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. **Theriogenology**, v. 54, n. 7, p. 1055-1064, Oct 2000.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology**, v. 57, n. 4, p. 1263-1272, Mar 2002.

- GUERREIRO, B. M. et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 49, p. 96-104, Oct 2014.
- LAHOZ, B. et al. Anti-Mullerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 347-357, Jan 2014.
- LASS, A. et al. Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. **Human Reproduction**, v. 12, n. 2, p. 294-297, Feb 1997.
- MONGET, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 139-154, Jul 2002.
- MONNIAUX, D. et al. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 845-854, Dec 2011.
- MOSSA, F. et al. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3-4, p. 391-396, Aug 2007.
- MURASAWA, M. et al. Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 5, p. 689-693, Oct 2005.
- RICO, C. et al. Anti-Mullerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 1, p. 50-59, Jan 2009.
- RUBIANES, E. et al. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 465-472, Jan 1995.
- SCARAMUZZI, R. J. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 444-467, 2011.
- SINGH, J. et al. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 227-243, Jul 2004.
- SYROP, C. H. et al. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. **Human Reproduction**, v. 14, n. 7, p. 1752-1756, Jul 1999.
- THOMPSON, J.; MEYER, H. Body condition scoring of sheep. Corvallis, Oregon 1994. Disponível em: <<http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/14303/ec1433.pdf>>. Acesso em: 03 May.

TOOSI, B. M.; SEEKALLU, S. V.; RAWLINGS, N. C. Effects of the Rate and Duration of Physiological Increases in Serum FSH Concentrations on Emergence of Follicular Waves in Cyclic Ewes. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 4, p. 648-655, Oct 2010.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. Features of follicle-stimulating hormone-stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 1328-1337, May 2008.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1973-1983, Apr 2005.

VINOLES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 1-2, p. 69-79, Jan 2004.

VISSER, J. A. et al. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 1-9, Jan 2006.

CAPÍTULO 4

AUMENTO DA DOSE DE FSH EM OVELHAS COM HISTÓRICO DE BAIXA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA

1 RESUMO

Ovelhas da raça Santa Inês foram submetidas a um prévio tratamento de superovulação, usando uma dose total de 133 mg de pFSH e, em seguida, agrupadas de acordo com o número de ovulações em baixa (≤ 6 CL) ou alta (≥ 10 CL) resposta ovulatória. Os animais de cada grupo foram submetidos a um segundo protocolo de superovulação com 133 mg ou 240 mg de pFSH. Houve uma correlação positiva entre o número de corpos lúteos do primeiro e segundo protocolo de superovulação, indicando que o histórico de ovulação pode ser usado para a seleção das ovelhas doadoras de embriões. Por outro lado, o aumento da dose de pFSH não modificou o padrão de resposta verificado na primeira superovulação, tornando inviável a sua aplicação em ovelhas com histórico de baixa resposta ovulatória.

Palavras chave: embriões, Santa Inês, corpo lúteo, seleção, superestimulação.

2 ABSTRACT

Santa Inês sheep breed were submitted to a previous superovulation treatment, using a total dose of 133 mg of pFSH, and then grouped according to the number of ovulations in low (≤ 6 CL) and high (≥ 10 CL) ovulatory response. The animals from each group were submitted to a second superovulation protocol with 133 mg or 240 mg of pFSH. There was a positive correlation between the number of corpora lutea of the first and second superovulation protocol, indicating that ovulation historic can be used for selection of embryo donor ewes. On the other hand, increasing the dose of pFSH did not modify the response pattern verified in the first superovulation, making it impracticable to apply it in sheep with a history of low ovulatory response.

Keywords: embryos, Santa Inês, corpus luteum, selection, superstimulation.

3 INTRODUÇÃO

A tecnologia de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) é uma ferramenta importante para o melhoramento genético e para a conservação de embriões de animais de raças ameaçadas ou que apresentem características de interesse. O sucesso de um programa MOTE depende de fatores intrínsecos e extrínsecos (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Nos últimos anos foram conseguidas significativas melhorias no controle desses fatores, gerando respostas superovulatórias e rendimento embrionário menos variáveis (Menchaca et al., 2010; Bartlewski et al., 2016).

O genótipo é um dos principais fatores intrínsecos que influenciam na resposta superovulatória (Bindon et al., 1986). A redução da variabilidade interindividual tem sido conseguida através da seleção das doadoras por dosagens hormonais (Fuerst et al., 2009; Lahoz et al., 2014) ou pelo histórico de ovulação em um simples tratamento de superovulação com a eCG (Bruno-Galarraga et al., 2014). Contudo, essas abordagens podem descartar de programas de superovulação, ovelhas de alto mérito genético. Uma alternativa que poderia contornar esse problema seria através do aumento da dose de FSH nas doadoras menos responsivas a superestimulação.

A raça também é um dos fatores que pode alterar a resposta ao FSH exógeno (Ammoun et al., 2006), no entanto, em ovinos da raça Santa Inês não existe um consenso sobre a melhor dose de FSH para a utilização em programas de superovulação e o efeito de diferentes doses de FSH não foi avaliado em ovelhas com histórico de alta e baixa resposta superovulatória. Portanto, objetivou-se avaliar, em ovelhas da raça Santa Inês, a relação entre o histórico de ovulação e a resposta superovulatória obtida em um segundo protocolo de superestimulação e avaliar se o aumento da dose de FSH exógeno poderia modificar o padrão de resposta em protocolos futuros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estação experimental e animais

O estudo foi realizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia localizada em Brasília (região Centro-Oeste do Brasil) a 15°52' de latitude S e altitude variando 1050-1250 m acima do nível do mar. Essa região apresenta um clima tropical chuvoso, com invernos secos e verões chuvosos, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo CEUA – Cenargen 548/2016).

Quarenta e quatro ovelhas Santa Inês, sexualmente maduras, clinicamente saudáveis, com idade entre 2,5 a 5 anos e escore de condição corporal $> 2,5$ (intervalo 1-5; (Thompson & Meyer, 1994), foram utilizadas neste estudo. Todos os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* e durante o período de superestimulação foram alocados em baias de confinamento e alimentados com feno de Tifton e ração balanceada (300 g/ovelha/dia), com acesso ilimitado à água e sal mineral em todos os períodos.

4.2 Pré-tratamento superovulatório

Todas as ovelhas tiveram o estro sincronizado (4 ou 6 ovelhas/dia) com a inserção (dia 0) de um CIDR por 7 dias. No dia 4, a superestimulação foi induzida com aplicação de 133 mg de pFSH I.M. (Folltropin[®]-V, Tecnopec, AHC Inc., Bioniche, Canada) em oito doses decrescentes (20% x 2; 15% x 2; 10% x 2; 5% x 2) administradas duas vezes ao dia, iniciada na manhã do dia 4 e finalizada 12 horas após a retirada do CIDR. Uma dose de PGF_{2α} (250 µg de cloprostenol; Sincrocio[®], Ouro Fino Saúde animal LTDA, Brasil) e de GnRH (25 µg de acetato de gonadorelina; Gestran Plus, Tecnopec, ARSA SRL, Argentina) foi administrada I.M. na 5 e 8 a injeção de pFSH, respectivamente. Sete dias após a remoção do CIDR, as doadoras com ≥ 3 CL foram submetidas a coleta de embriões (Figura 1).

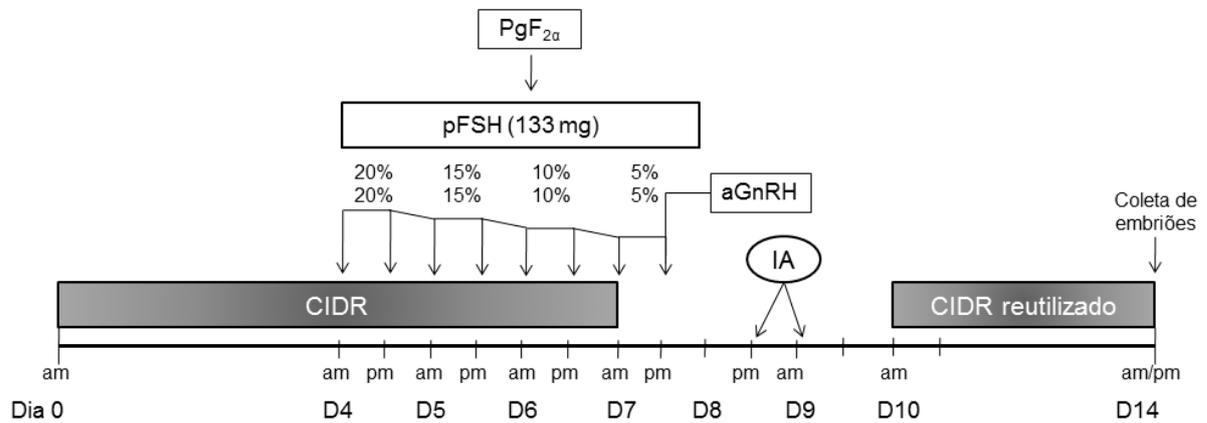


Figura. 1. Esquema do tratamento das ovelhas Santa Inês que receberam um CIDR no dia 0 (início do experimento) e mantido por 7 dias. Todas as ovelhas receberam, injeções de pFSH I.M., duas vezes ao dia, por um período de 4 dias, com início no dia 4. Uma dose de PGF_{2α} (250 µg de cloprostenol) e agonista de GnRH (25 µg de acetato de gonadorelina) foi administrada I.M. na 5 e 8 a injeção de pFSH, respectivamente. Todas as ovelhas foram inseminadas as 36 e 48 h após a remoção do dispositivo, e um CIDR anteriormente utilizado foi inserido um dia após a segunda inseminação (dia 10). Os ovócitos/embriões foram coletados 7 dias após a remoção do CIDR (dia 14) por laparotomia.

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram agrupados, de acordo com o número de CL obtidos no primeiro tratamento superovulatório, em doadoras com resposta ovulatória baixa (≤ 6 CL),

intermediária (7 a 9 CL) e alta (≥ 10 CL; Tabela 1). Para assegurar uma maior diferença entre os grupos, as doadoras com resposta intermediária não foram utilizadas na segunda superovulação. Os grupos de baixa (n = 15) e alta (n = 18) resposta ovulatória foram superestimuladas com 133 mg ou 240 mg de pFSH, utilizando o mesmo procedimento descrito no primeiro protocolo de superovulação. Foram formados quatro grupos: baixa ovulação com 133 mg (BO133; n = 7), baixa ovulação com 240 mg (BO240; n = 8), alta ovulação com 133 mg (AO133; n = 9) e alta ovulação com 240 mg (AO240; n = 9). A segunda coleta de embriões ocorreu com intervalo entre 60 a 70 dias após a primeira. Nesse procedimento, foram coletadas todas as doadoras que apresentaram ≥ 1 CL.

Tabela 1. Número de animais agrupados de acordo com o número de CL, em baixa (≤ 6), intermediária (7 a 9) e alta (≥ 10) ovulação, após o primeiro tratamento superovulatório

Grupo	Número de CL	Animais
Baixa	0	2
	1	1
	2	3
	3	2
	4	3
	5	2
	6	2
	$3,1 \pm 2,0^2$	15 (34%) ³
Intermediária ¹	7	3
	8	3
	9	5
	$8,2 \pm 2,0^2$	11 (25%) ³
Alta	10	5
	11	1
	12	2
	13	2
	14	1
	15	3
	17	1
	18	1
	19	1
	30	1
	$14,1 \pm 4,9^2$	18 (41%) ³

¹ Doadoras com resposta ovulatória intermediária não foram utilizadas no segundo procedimento de superovulação.

² Média \pm desvio padrão do número de CL em cada grupo (baixa, intermediária e alta ovulação).

³ Total de animais em cada grupo

4.4 Coleta de sêmen e inseminação artificial (IA)

O sêmen foi coletado de três carneiros de fertilidade comprovada utilizando um vaginal artificial, e usado em todas as IA. Os carneiros foram previamente selecionados pelas seguintes características seminais: (1) concentração $\geq 3 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$; (2) motilidade massal ≥ 3 ; (3) motilidade espermática $\geq 80\%$; (4) vigor ≥ 3 ; e (5) total de patologias espermática $\leq 20\%$ (CBRA, 2013). Todas as fêmeas foram inseminadas, com sêmen fresco, por via cervical. A IA foi realizada as 36 e 48 h após a retirada do CIDR, usando palhetas de 0,5 mL. Imediatamente antes da IA, o sêmen dos carneiros foi coletado, reunido em *pool* e mantido em banho-maria a 33°C. As ovelhas foram contidas com os membros posteriores levantados, e o cérvix foi localizado usando um espéculo vaginal equipado com uma fonte de luz. O sêmen foi depositado, na medida do possível, o mais profundo dentro do canal cervical, mas sem uso de força. Um dia após a segunda IA, o CIDR previamente utilizado foi inserido em cada fêmea e mantido até o momento da coleta de embriões.

4.5 Resposta ovulatória e produção de embriões

No dia 7 após a remoção do CIDR, o número de ovulações foi verificado por laparoscopia. Imediatamente depois, os embriões foram cirurgicamente recuperados sob anestesia geral. As ovelhas, previamente privadas de comida e água por 24 h, receberam xilazina (0,10 mg/kg I.M.; Rompun[®], Bayer, Brasil) e cloridrato de cetamina (3,5 mg/kg por via intravenosa; Ketamina, Agener, Brasil). Além disso, foi administrada anestesia local na região da incisão cirúrgica (10 mL de lidocaína; Lidovet[®], Bravet, Brasil). Cada corno uterino foi lavado com 60 mL de meio de recuperação de embriões (DPBS, Cultilab, Brasil), pré-aquecido a 38°C, e suplementado com 1% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). Resumidamente, o meio de lavagem foi injetado através de uma seringa estéril, com um cateter 20G inserido perto da junção útero-tubária e recolhidas através de uma sonda Foley n.8 ou n.10, que foi inserida na bifurcação externa de cada corno uterino. Os ovócitos/embriões foram recuperados em uma placa de Petri, mantidos em meio holding (Holding plus, 0,4% de BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil), e examinadas sob um estereomicroscópio (Olympus SZ; Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão) com 20 a 40 \times de ampliação, seguindo os critérios

da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Os embriões que desenvolveram a fases de blastocisto ou mórula foram classificados da seguinte forma: grau 1 (excelente ou bom), 2 (bom/regular), 3 (pobre), e 4 (mortos ou degenerados). Os embriões classificados com grau de 1 a 3 foram considerados transferíveis e aqueles de grau 1 e 2 foram consideradas como embriões congeláveis. Após a cirurgia, todos os animais receberam uma injeção I.M. de PGF2 α (250 μ g de cloprostenol) e o CIDR foi removido.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizados utilizando o programa SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), com diferenças consideradas significativas quando o $P \leq 0,05$. O efeito da dose, o histórico de resposta e a interação dose vs reposta foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA), através do o modelo linear generalizado misto (procedimento GLIMMIX). Além disso, o coeficiente de correlação de Pearson foi realizado entre o número de CL no primeiro e segundo tratamento superestimulatório.

5 RESULTADOS

No presente estudo, a repetibilidade da resposta ovulatória foi obtida através da comparação do número de CL entre o primeiro e o segundo protocolo superovulatório. Quinze ovelhas apresentaram resposta ovulatória baixa no primeiro tratamento, destas, 60% (9/15) permaneceram com o mesmo padrão de resposta (≤ 6 CL) no segundo tratamento, enquanto que, 40% dos animais restantes apresentaram resposta de intermediária (3/15) a alta (3/15). Das dezoito fêmeas que apresentaram resposta ovulatória alta no primeiro tratamento, 61% (11/18) permaneceram com a mesma resposta (≥ 10 CL) no segundo, ao passo que, 39% das fêmeas apresentaram resposta de intermediária (3/18) a baixa (4/18). Ao todo, 61% (20/33) das doadoras apresentaram resposta ovulatória coincidentes de baixa ou alta no segundo protocolo de superovulação. Houve uma correlação positiva significativa ($r = 0,51$; $P = 0,002$) entre o número de CL no primeiro e segundo protocolo de superovulação.

Tabela 2. Resposta ovariana e produção de embriões (Média \pm D.P.) em doadoras da raça Santa Inês com histórico de baixa ou alta resposta ovulatória, submetidas a um segundo tratamento de superestimulação com pFSH

	Baixa (≤ 6 CL)	Alta (≥ 10 CL)
Resposta das Doadoras		
Doadoras com ≥ 1 CL (%)	14/15 (93)	18/18 (100)
Doadoras com RPCL (%)	2/14 (14)	6/18 (33)
Produção de embriões (total de doadoras)		
Número de CL	6,0 \pm 3,8 ^b	10,3 \pm 5,3 ^a
Total de estruturas recuperadas	4,2 \pm 3,2	6,6 \pm 5,2
Total de embriões	3,6 \pm 3,1	4,9 \pm 4,8
Embriões viáveis	2,8 \pm 3,1	4,1 \pm 4,2
Embriões congeláveis	2,4 \pm 2,9	3,7 \pm 3,9
Embriões degenerados	0,8 \pm 1,4	0,8 \pm 1,4

^{a,b} Letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Não houve efeito da dose e interações entre a dose de FSH e o histórico de resposta das doadoras ($P > 0,05$) em nenhuma das variáveis de rendimento superovulatório e produção de embriões analisadas. Entretanto, foi verificado um efeito do histórico de resposta ovulatória sobre o número de CL ($P < 0,05$), portanto, os dados foram agrupados de acordo com o histórico de baixa ou alta resposta ovulatória (Tabela 2). Não houve diferença entre os tratamentos na taxa de recuperação e fertilização, sendo a taxa global de 66% e 78%, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

A variabilidade na resposta ovulatória e rendimento embrionário é um dos principais limitantes para a difusão da tecnologia de múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos. Os resultados deste estudo confirmam que o histórico de ovulação, de um prévio programa de superovulação, pode ser usado para identificar as doadoras mais responsivas as futuras superestimulação com pFSH exógeno. Contudo, o aumento da dose de pFSH não altera o número de ovulações e o rendimento embrionário em ovelhas deslanadas com histórico de baixa ou alta resposta ovulatória.

A administração de 800 UI de eCG no fim de um tratamento com progestágeno é recomendada como um método simples e eficiente para diferenciar ovelhas (Bruno-Galarraga et al., 2014) e cabras (Balaro et al., 2016) com alta e baixa resposta ovulatória. No presente estudo, houve uma correlação positiva entre o número de ovulações entre o primeiro e o segundo protocolo de superovulação ($r = 0,51$). A identificação das doadoras mais responsivas permite realizar programas MOTE com menor variabilidade dos resultados, torna o protocolo de superovulação mais econômico e evita procedimento cirúrgico em fêmeas pouco responsivas, atendendo melhor os princípios de bem-estar animal.

Ovelhas com histórico de alta resposta apresentaram um maior número de corpos lúteos, contudo, o rendimento embrionário não foi afetado de forma semelhante (Tabela 1). Contrariamente, no estudo com a prévia seleção com eCG, em ovelhas da raça Merino (Bruno-Galarraga et al., 2014), tanto a resposta superovulatória quanto os parâmetros de rendimento embrionário foram superiores em ovelhas consideradas de alta resposta. Acreditamos que o histórico de ovulação é uma ferramenta que deve ser utilizado para a pré-seleção de doadoras de embriões, uma vez que, o número de ovulações é altamente correlacionado com o número de embriões recuperados (Fuerst et al., 2009).

Contrariamente ao esperado a dose de pFSH não aumentou a resposta superovulatória em nenhum dos grupos em ovelhas Santa Inês. Já em ovinos Dorper, a dose de 200 mg apresentou um maior efeito superovulatório em relação a de 128 mg (Loiola et al., 2015). Sabe-se que o genótipo é um dos principais fatores intrínsecos que influenciam na variabilidade da resposta superovulatória (Bindon et al., 1986), o que pode ser explicado principalmente por diferenças raciais na dinâmica folicular em resposta ao FSH exógeno (Ammoun et al., 2006). Em um estudo com ovinos das raças Morada Nova e Somalis Brasileira, o protocolo com a mesma dose de pFSH (133 mg), resultou em diferentes números de ovulações e rendimento embrionário entre as raças (Brasil et al., 2016). No presente estudo, a dose de 133 mg de pFSH foi suficiente para desencadear a máxima resposta superovulatória em ovinos Santa Inês, independente do histórico de ovulação. Portanto, doses iguais ou diferentes de FSH exógeno podem ter efeitos distintos entre raças. Possivelmente o aumento da dose, em cada raça, somente surtiria efeito caso essa ainda não tivesse atingido o seu potencial de superovulação. Diante disso, hipotetiza-se que exista uma dose mínima de FSH para a obtenção da máxima resposta superovulatória, e a identificação dessa dose nas diferentes raças trariam benefícios econômicos para os programas MOTE.

Em resumo, o histórico de resposta superovulatória pode ser utilizado como uma ferramenta para a seleção de doadoras com potencial de resposta ao FSH exógeno, podendo ser empregado nos programas de MOTE. Por outro lado, o aumento da dose de FSH não melhora a resposta superovulatória em ovelhas com histórico de baixa ovulação, sendo essa, uma abordagem desnecessária.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.

AMMOUN, I. et al. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 896-905, Sep 2006.

BALARO, M. F. A. et al. Pre-Selection Test to Identify High Responder Donor Goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 386-391, Jun 2016.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 130-143, Jul 2016.

BINDON, B. M. et al. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 53-70, Jan 1986.

BRASIL, O. O. et al. Produção de embriões em ovinos Morada Nova e Somalis Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1390-1394, 2016.

BRUNO-GALARRAGA, M. M. et al. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 84-89, Jul 2014.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. ANIMAL, C. B. D. R. Belo Horizonte: CBRA 2013.

FUERST, K. J.; BARTLEWSKI, P. M.; KING, W. A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v. 82, n. 2-3, p. 144-148, Apr 2009.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 421-435, 2004.

LAHOZ, B. et al. Anti-Mullerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 347-357, Jan 2014.

LOIOLA, J. B. et al. Effect of pFSH dose reduction on in vivo embryo production in Dorper ewes. **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 36, n. 6, p. 4215-4224, 2015.

MENCHACA, A. et al. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 113-118, 2010.

THOMPSON, J.; MEYER, H. Body condition scoring of sheep. Corvallis, Oregon 1994. Disponível em: <<http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/14303/ec1433.pdf>>. Acesso em: 03 May.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução da variabilidade e o aumento da resposta superovulatória e rendimento embrionário são importantes para a difusão dos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões. Isso pode ser conseguido pela avaliação ultrassonográfica do número dos folículos $\geq 2\text{mm}$, realizada 4,5 dias após pré-tratamento de sincronização com prostaglandina e o histórico de um prévio protocolo superovulatório, que permite selecionar doadoras de embriões mais responsivas ao FSH.

Contrariamente ao esperado, a superestimulação iniciada na emergência da onda folicular não melhora a resposta superovulatória e a produção de embriões. Além disso, a avaliação ultrassonográfica das dimensões ovarianas não serve como um método de seleção de ovelhas doadoras de embriões e o aumento da dose de FSH, uma vez que a dose utilizada seja suficiente para atingir a máxima resposta ovulatória, não melhora a resposta superovulatória. Portanto, essas abordagens aumentariam o custo e o manejo desnecessariamente.