



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

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS
DA RAÇA BERGAMÁCIA BRASILEIRA**

ANA PAULA DE MELO LISBÔA KOLLING

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2020**



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

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS
DA RAÇA BERGAMÁCIA BRASILEIRA**

ALUNA: ANA PAULA DE MELO LISBÔA KOLLING

ORIENTADOR: ALEXANDRE FLORIANI RAMOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 222/2020

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2020**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

KOLLING, A. P. M. L. **Resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas da raça Bergamácia Brasileira.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 44 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado 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 dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

KOLLING, Ana Paula de Melo Lisbôa **resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas da raça Bergamácia.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2020.

1. Superovulação. 2. Ovino. 3. Embrião.
2. 4. Bergamácia Brasileira. I Ramos, A. F. II. Título.

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS
DA RAÇA BERGAMÁCIA BRASILEIRA**

ANA PAULA DE MELO LISBÔA KOLLING

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

APROVADA POR:

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

**RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)
(AVALIADOR INTERNO)**

**BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA) (AVALIADORA EXTERNA)**

BRASÍLIA/DF, 27 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter movido todos os obstáculos para que eu conseguisse concluir tudo o que me era proposto.

À minha família, especialmente minha mãe, Dona Arilma maravilhosa, por todo apoio psicológico e financeiro para o desenvolvimento de todo esse trabalho.

Ao meu esposo, Richard, que desde sempre se disponibilizou para me ajudar em tudo o que foi necessário. Obrigada por todo incentivo e por todas às vezes que puxou minha orelha para que eu largasse a preguiça e por sempre estar ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador Dr. Alexandre Floriani Ramos por todo ensinamento, bronca, paciência e resiliência para com o meu desenvolvimento intelectual e profissional. O senhor foi fundamental em todos os quesitos.

E ainda agradeço a todos os colaboradores da Embrapa por toda ajuda, paciência e ensinamentos passados. Aos amigos feitos por toda essa trajetória na Embrapa que nunca disseram não para nenhuma ajuda solicitada.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	01
1 INTRODUÇÃO.....	02
1.1 OBJETIVO GERAL.....	04
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	04
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Conservação de recursos genéticos animais.....	05
2.2 Ovelhas da raça Bergamácia Brasileira.....	06
2.3 Superovulação ovina e produção <i>in vivo</i> de embrião.....	08
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 2 – RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA BRASILEIRA.....	23
1 RESUMO.....	24
2 ABSTRACT.....	25
3 INTRODUÇÃO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Local do experimento e animais.....	28
4.2 Delineamento experimental e avaliação ultrassonográfica.....	28
4.3 Protocolo de superovulação e coleta de embrião.....	29
4.4 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	32
6 DISCUSSÃO.....	35
7 CONCLUSÃO.....	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 2	
Resposta ovariana e produção embrionária (média \pm desvio padrão) de ovelhas Bergamácia Brasileira com baixa (G3META), média (G2META) e alta (G1META) população folicular na fase de metaestro submetidas ao protocolo de superovulação	31
Correlação de Pearson (valor r) entre a população folicular e a produção embrionária de ovelhas Bergamácia Brasileira submetidas a protocolo de superovulação	32
Resposta ovariana e produção embrionária (média \pm desvio padrão) de ovelhas Bergamácia Brasileira com e sem regressão precoce do corpo lúteo (RPCL) submetidas a protocolo de superovulação	32

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

> - Maior

\geq - Maior ou igual

< - Menor

\leq - Menor ou igual

°C - Graus Celsius

μg - Micrograma

% - Porcentagem

ANOVA - Análise de Variância

ARCO - Associação de Criadores de Ovinos

BBGA - Banco Brasileiro de Germoplasma Animal

CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal

CFA - Contagem de Folículos Antrais

CIDR - Dispositivo Interno de Liberação de Progesterona

CL - Corpo Lúteo

cm - Centímetro

DF - Distrito Federal

ECC - Escore de Condição Corporal

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAL - Fazenda Água Limpa

FOLMETA - Folículos no Metaestro

FOLSOV - Folículos no Início da Superovulação

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

g - Gramas

GAPFol - Grupo de Alta População Folicular

GBPFol - Grupo de Baixa População Folicular

GMPFol - Grupo de Média População Folicular

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

h - Horas

HAM - Hormônio Anti-Mülleriano

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IM - Intramuscular
LH - Hormônio Luteinizante
Kg - Quilograma
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg - Miligramas
mL - Mililitros
mm - Milímetro
hMG - Gonadotrofina Menopáusica Humana
MN - Monta Natural
oFSH - Hormônio Folículo Estimulante de origem ovina
P - Probabilidade de erro
P₄ - Progesterona
PBS - Tampão Fosfato Salina
pFSH - Hormônio Folículo Estimulante de origem suína
RPCL - Regressão Prematura de Corpo Lúteo
SAEG - Sistema para Análises Estatísticas
SOV - Superovulação
TR - Taxa de Recuperação
UI - Unidades Internacionais
UnB – Universidade de Brasília
US - Ultrassonografia

RESUMO

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA BRASILEIRA

Ana Paula de Melo Lisbôa Kolling¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

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

O objetivo deste trabalho foi quantificar a resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas Bergamácia Brasileira e relacioná-las com a condição folicular antes do tratamento superovulatório, como referência para seleção de doadoras com potencial para superovulação. Vinte e três ovelhas foram avaliadas quanto a população folicular por ultrassonografia na fase de metaestro do ciclo estral e divididas em grupos com baixa, média e alta população folicular. Posteriormente foram sincronizadas, superovuladas com 133mg de pFSH, acasaladas e submetidas a coleta de embriões. A resposta superovulatória ($9,0 \pm 3,3$ vs $10,7 \pm 6,2$ vs $13,8 \pm 7,1$) e produção embrionária ($4,0 \pm 3,8$ vs $2,6 \pm 2,0$ vs $1,8 \pm 4,0$) foram semelhantes entre os grupos ($P > 0,05$). Houve correlação positiva entre o número de folículos no metaestro e o número de corpos lúteos com regressão prematura (RPCL) (0,52) e correlação negativa entre a taxa de recuperação e RPCL (-0,44) ($P < 0,05$). As ovelhas que apresentaram RPCL tiveram mais folículos no metaestro ($16,9 \pm 7,8$ vs $12,7 \pm 3,2$) e menor taxa de recuperação embrionária ($38,8 \pm 29,3$ vs $72,2 \pm 29,9$) do que as que apresentaram CLs funcionais ($P < 0,05$). A quantificação folicular nas fases de metaestro não foi capaz de identificar doadoras com alto potencial de produção embrionária. Animais com RPCL tiveram maior população folicular no metaestro e menor recuperação de embriões.

Palavras chaves: Bergamácia Brasileira, conservação, embrião, ovino, superovulação.

ABSTRACT

SUPEROVULATORY RESPONSE AND EMBRYONIC PRODUCTION OF BRAZILIAN BERGAMASCA SHEEP

Ana Paula de Melo Lisboa Kolling¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

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

The objective was to quantify the superovulatory response and embryonic production of Brazilian Bergamasca sheep and to relate them to the follicular condition before superovulatory treatment, as a reference for selection of donors with potential for superovulation. Twenty-three sheep were evaluated for the follicular population by ultrasound in the metestrus phase of the estrous cycle and divided into groups with low, medium and high follicular population. Subsequently, they were synchronized, superovulated with 133mg of pFSH, mated and subjected to embryo collection. The superovulatory response (9.0 ± 3.3 vs 10.7 ± 6.2 vs 13.8 ± 7.1) and embryonic production (4.0 ± 3.8 vs 2.6 ± 2.0 vs 1.8 ± 4.0) were similar between groups ($P > 0.05$). There was a positive correlation between the number of follicles in the metestrus and the number of corpus luteum with premature regression (PLR) (0.52) and a negative correlation between the recovery rate and PLR (-0.44) ($P < 0.05$). The sheep that presented PLR had more follicles in the metestrus (16.9 ± 7.8 vs 12.7 ± 3.2) and a lower embryo recovery rate (38.8 ± 29.3 vs 72.2 ± 29.9) than those with functional CLs ($P < 0.05$). Follicular quantification in the metestrus phases was not able to identify donors with high potential for embryonic production. Animals with PLR had a larger follicular population in the metestrus and less embryo recovery.

Keywords: Brazilian Bergamasca, conservation, embryo, sheep, superovulation.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos são animais que tem ótima capacidade de adaptação em diferentes ambientes, climas e vegetações, por isso estão difundidos em todo território mundial (VIANA, 2008). Contudo observa-se uma maior concentração deles em países desenvolvidos e principalmente em desenvolvimento (MARTINS *et al.*, 2016), onde tem-se climas desfavoráveis ou território em sua maioria subfértis (IBGE, 2011).

Estão muitas vezes ligados a agricultura familiar que quando comparados a produção de bovinos, a ovinocultura exige menos investimento para implantação e manutenção, além de retorno rápido, pois, seu ciclo de produção é curto (SANTOS, 2019).

No Brasil, o rebanho ovino está em constante aumento, desde o censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2006, aumentando de 14 milhões para 18 milhões de cabeças (EMBRAPA, 2018), principalmente na Região Nordeste, concentrando em 64,2% de cabeças, continuando como o local mais populoso do rebanho seguido pelas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Norte (IBGE, 2017).

No rebanho nacional, encontram-se registrados pela Associação de Criadores de Ovinos (ARCO), que é credenciada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) 27 raças de ovinos, lanados ou não, localmente adaptados (MCMANUS *et al.*, 2014a) com rusticidade e fertilidade apuradas, que se tornaram importantes na formação do rebanho ovino brasileiro (MORAES, 2012).

Dentre elas, segundo Albuquerque e Lanella (2017), sete raças foram inseridas aos Núcleos de Conservação de Ovinos e são comumente utilizadas em experimentos para a multiplicação e conservação dos recursos genéticos para enriquecimento do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), como por exemplo a raça lanada Bergamácia Brasileira que é uma raça lanada que tem uma importância sociocultural na ovinocultura brasileira, pois

tem contribuição para com o cruzamento de outras raças, onde cada uma representa um patrimônio genético essencial para a manutenção da espécie (SANTOS, 2019).

É uma raça que evoluiu ao longo do tempo e se adaptou por meio da seleção natural, se tornando uma raça localmente adaptada reconhecida pelo MAPA em 1978 (MACHADO, 2001). Em 1982 foi criado um núcleo de conservação da raça em Brasília na Universidade de Brasília (UnB) (MCMANUS *et al.*, 2003) e incluída no Programa de Conservação de Recursos Genéticos Pecuários pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em 2008 (MARIANTE *et al.*, 2009). Em 2015, as últimas doze matrizes e três reprodutores da raça que formavam o Núcleo de Conservação da UnB foram transferidos para a Fazenda Sucupira pertencente EMBRAPA para formar o que atualmente é o núcleo de conservação da raça no Distrito Federal (DF).

A aplicação de biotécnicas da reprodução, como a superovulação (SOV), para a conservação e multiplicação dos recursos genéticos dos animais localmente adaptados é importante, porém, de acordo com Amiridis e Cseh (2012) a resposta ovariana por meio dos protocolos em ovelhas superovuladas ainda demonstra grande variação na resposta, podendo ser uma limitação no uso da biotécnica para recuperação de embriões viáveis e congeláveis, por mais que os estudos da dinâmica folicular e da utilização dos hormônios tenha sido motivo de investigação por pesquisadores.

Contudo, a SOV ovina tem um grande potencial para alcançar resultados satisfatórios num curto espaço de tempo além de sua utilização ser crescente no âmbito da pesquisa e da produção, pois, segundo Lopes Júnior *et al.*, 2014, necessita unicamente de um protocolo de sincronização de estro e uma estimulação hormonal ovariana para o desenvolvimento e a maturação de vários folículos concomitantemente, e de um manipulador experiente.

Diante disso, a utilização de metodologias que nos permitam a seleção prévia de doadoras com alto potencial para a produção de embriões viáveis e congeláveis adjunto de um protocolo de SOV ovina estão sendo estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta superovulatória e embrionária de ovelhas Bergamácia Brasileira e sua relação com a população folicular para utilização como ferramenta na seleção de doadoras.

2.2 Objetivos Específicos

Quantificar a resposta superovulatória e embrionária de ovelhas da raça Bergamácia Brasileira;

Correlacionar a população folicular na fase de metaestro do ciclo estral e no início a superovulação com a resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas Bergamácia Brasileira;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conservação de Recursos Genéticos Animais

A conservação de recursos genéticos animais é uma possibilidade que visa a diminuição constante da perda das espécies animais por causa da degradação e exploração contínua do meio ambiente desencadeando a diminuição da biodiversidade, onde a extinção se torna maior que a especiação podendo ser algo irreversível (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

A garantia da sobrevivência de uma espécie se dá pela quantidade mínima viável de uma população (BRITO e FONSECA, 2006). Quando essa garantia não é alcançada por meios naturais e para se obter uma mínima variabilidade genética, populacional e ecológica é necessária uma manipulação para a manutenção e permanência dessas espécies (CULLEN JUNIOR *et al.*, 2003).

Com a colonização do Brasil, foram trazidas raças de animais domésticos que ao longo dos anos sofreram uma seleção natural em ambientes diferentes do qual estavam acostumados, desenvolvendo características específicas de adaptação, apesar disso, no século XX, houve uma maciça importação de raças exóticas mais produtivas, embora elas não apresentassem características adaptativas das raças nativas (EGITO *et al.*, 2002) e de acordo com Egito *et al.* (2002), esta importação propiciou uma substituição gradativa das raças localmente adaptadas possibilitando sua extinção.

Para que não houvesse a perda desse material genético importante e insubstituível, em 1983 a EMBRAPA incluiu em seu Programa de

Conservação de Recursos Genéticos Pecuários, para abastecer o BBGA, as raças localmente adaptadas consideradas em extinção, pois só havia conservação de espécies vegetais (MARIANTE *et al.*, 2011).

Segundo Mariante *et al.* (2011), algumas metodologias são utilizadas para a conservação dos recursos genéticos animais e conforme Boef *et al.* (2007) podem ser utilizadas separadas ou paralelamente, sendo elas:

- a) Conservação *in situ*, onde os núcleos de conservação mantêm os animais nos locais da seleção natural, sendo importantíssimo no sistema de conservação de recursos genéticos do Brasil. Por isso, promove a manutenção e recuperação das populações de espécies animais nos locais onde adquiriram características diferenciadas (BOEF *et al.*, 2007), além de permitir a continuação dos processos evolucionários naturais, sendo a melhor estratégia para preservar a diversidade biológica (PRIMACK e RODRIGUES, 2001);
- b) Conservação *ex situ* que se divide em dois tipos: conservação *ex situ in vivo*, na qual os animais localmente adaptados são mantidos fora do seu habitat primordial, ou seja, do local onde sofreram seleção natural. Implementando técnicas que visam reduzir a perda da diversidade genética e retroceder a extinção. A desvantagem é a necessidade de se utilizar espaços e estruturas adequadas (CNCFLORA, 2016). E conservação *ex situ in vitro*, que se fundamenta na utilização de técnicas modernas de criopreservação e armazenamento dos materiais genéticos (sêmen, embriões e ovócitos) em bancos de germoplasma animal (MARIANTE *et al.*, 2011).

Nos últimos cinco séculos, as raças localmente adaptadas desenvolveram características adaptativas (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000) importantes para a sua utilização em trabalhos de melhoramento animal com a caracterização genética sobre cada raça conservada, sendo importante também para os programas de seleção de doadoras contribuindo com o BBGA (MARIANTE *et al.*, 2011). Além disso, obtiveram características singulares de prolificidade, rusticidade, resistência a endo e ectoparasitas e doenças das mais diferentes regiões brasileiras (EGITO *et al.*, 2002) e um potencial para a produção no modelo de agricultura sustentável, pois, com a seleção natural desenvolveram adaptação local tornando-se fonte de variabilidade genética (HENSON, 2004) com uso potencial desses recursos no futuro.

3.2 Ovelhas da Raça Bergamácia Brasileira

A Bieleza ou Gigante de Bergamo é uma raça oriunda da região da Lombardia na Itália (OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, 2012) que foi introduzida no Brasil no início do século XX, mais precisamente na década de 30 junto com a imigração italiana (PAIVA *et al.*, 2005) se adaptando muito bem nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do Brasil (VIEIRA, 1967), o que é observado atualmente. São ovelhas lanadas, brancas, de grande porte e mochas, onde as orelhas são pendentes e não se é admitido manchas na cabeça, corpo e membros, apresentam rusticidade e não são exigentes quanto à alimentação (VAZ, 2007).

Passadas gerações de seleção natural e com a diferença geográfica do seu país de origem, desenvolveram particularidades genéticas que as diferenciaram de seus ancestrais, sendo então nominadas de Bergamácia Brasileira (Egito *et al.*, 2002).

Apesar de já estarem difundidas no país, foram progressivamente sendo substituídas, pelos criadores, por outras raças, principalmente as deslanadas, sendo considerada em perigo de extinção (MACEDO *et al.*, 1996). Por ser uma raça com múltipla aptidão (carne, leite e lã) no Brasil, diferentemente do seu país de origem que é somente para produção de carne e lã (OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, 2012), destacou-se para ser estudada por instituições de pesquisa brasileira (MIRANDA e MCMANUS, 2000).

Por causa do processo de extinção foi criado um núcleo de conservação de ovinos para a Bergamácia Brasileira, no DF, na Fazenda Água Limpa (FAL) da UnB em 1982 (MCMANUS *et al.*, 2003) e para aprimorar as pesquisas foi incluída no Programa de Conservação de Recursos Genéticos Pecuários, pela EMBRAPA em 2008 (MARIANTE *et al.*, 2009). Em 2015, foram transferidas para o Campo Experimental Fazenda Sucupira, onde hoje é o núcleo de conservação do DF, totalizando, no último senso realizado em 2016, 22 animais da raça Bergamácia Brasileira (EMBRAPA, 2017).

São ovinos localmente adaptados que tem uma importância sociocultural na ovinocultura do Brasil, participando na formação de outras raças que contribuem com o patrimônio genético essencial para a manutenção da espécie (SANTOS, 2019), por exemplo, na formação da raça Santa Inês, que tem alta prolificidade, habilidade materna, qualidade de carne e baixo teor de gordura (SILVA *et al.*, 2012).

A prolificidade é alta com alguns partos duplos (12,63%), porém em estudos realizados em Brasília, não se conseguiu atingir os parâmetros raciais da Itália e dos rebanhos brasileiros, mas se equiparou aos ovinos deslanados tropicais criados no Brasil (MIRANDA e MCMANUS, 2000). Além disso, estudos mostraram que a Bergamácia Brasileira possui baixo nível de endogamia favorecendo a variabilidade genética contribuindo para a conservação da

raça (BRITO *et al.*, 2018). Em Brasília, estudos mostraram que as ovelhas da raça Bergamácia Brasileira demonstram atividade reprodutiva em todo o ano, apesar de terem manifestado um ciclo estral irregular em épocas com o fotoperíodo positivo, ou seja, na primavera e no verão (COSTA, 2018).

O registro oficial de *pedigree* da raça é feito pela ARCO que contém 54 rebanhos registrados até 2014 que são distribuídos em 45 municípios brasileiros (MCMANUS *et al.*, 2014b), e quando se compara com outras raças os registros ainda são reduzidos obtendo-se poucos dados evidenciando a necessidade de mais estudos para valorizar os grandes potenciais reprodutivos da raça.

3.3 Superovulação ovina e produção *in vivo* de embrião

Promover um melhoramento genético animal, potencializando as taxas das ovulações e a quantidade de embriões é um desafio a ser alcançado utilizando técnicas para a colheita de embriões viáveis e congeláveis, sendo uma ferramenta interessante para multiplicar raças que se encontram ameaçadas de extinção (LOPES JÚNIOR *et al.*, 2014) e também de uma prole com alto valor genético (ALVAREZ e FEITOZA, 1991), como por exemplo a SOV.

A superovulação é uma biotécnica da reprodução crescente no âmbito da pesquisa e da produção animal (FONSECA *et al.*, 2014) que consiste na aplicação de doses elevadas do hormônio folículo estimulante (FSH) promovendo a estimulação hormonal ovariana para o desenvolvimento e a maturação de vários folículos concomitantemente (LOPES JÚNIOR *et al.*, 2014) sendo muito utilizada em ovinos.

Contudo, mesmo com todo conhecimento obtido a respeito da dinâmica folicular das ovelhas, a uniformidade na resposta da SOV com a recuperação de embriões viáveis, transferíveis e congeláveis ainda é variável e limitante (AMIRIDIS e CSEH, 2012) sendo uma dificuldade notável em 20 a 30% das fêmeas tratadas (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2000) além da necessidade de etapas cirúrgicas (LEDDA e GONZALEZ-BULNES, 2018) carecendo de pesquisas para aprimoramento.

Para o aproveitamento dessa biotécnica deve-se considerar a sanidade, nutrição, estado fisiológico, escore de condição corporal (ECC), ter um exame ginecológico favorável e instalações adequadas para alocar as doadoras. (FONSECA *et al.*, 2007). Ademais, um ponto muito importante é a seleção das doadoras, pois a escolha de fêmeas com alto valor genético

garantirá uma acelerada multiplicação desse potencial genético, afetando positivamente o melhoramento animal (FONSECA, 2006).

Além disso é necessário avaliar outros fatores intrínsecos e extrínsecos, como por exemplo, a genética, a estação do ano, a idade, o manejo, o estresse causado, o protocolo adotado e a gonadotrofina escolhida (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2004). Acredita-se que os fatores intrínsecos são os principais responsáveis pela variabilidade na resposta ovariana, pois os extrínsecos tendem-se a ter um maior controle (BRASIL, 2016).

A condição ovariana no início do tratamento estimulatório pode interferir no resultado da superovulação, ainda mais quando se tem folículos com diâmetro ≥ 6 mm causando a redução das ovulações (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2004). Com a ausência de folículos grandes e um maior número de folículos antrais pequenos (2-3 mm), a resposta ovulatória e a produção de embriões tem melhores resultados (COGNIE *et al.*, 2003). Em cabras, a contagem de folículos antrais foi altamente correlacionado com a quantidade de corpos lúteos (CL) e embriões transferíveis após a SOV (MONNIAUX *et al.*, 2011; BALARO *et al.*, 2016).

Segundo Bartlewski *et al.* (2008) a resposta ovariana está associada as características do ovário no início da superovulação administrando gonadotrofinas exógenas. Além disso estudos registram que a quantidade de folículos está fortemente relacionada com o índice de ovulações e a quantidade de embriões viáveis recuperados (MOSSA *et al.*, 2007). No entanto, em ovelhas, a avaliação de folículos antrais correlacionados com a produção de CL após a SOV não está bem estabelecida (BARTLEWSKI *et al.*, 2008).

Estudos realizados com ovelhas Santa Inês propuseram correlacionar a população folicular das ovelhas em diferentes fases do ciclo estral (pró-estro, estro, metaestro e diestro) com a resposta superovulatória e obteve resultados bastantes satisfatórios na fase de metaestro (primeira fase luteínica), demonstrando ser uma abordagem possível para a seleção de doadoras de embriões (BRASIL, 2016).

A avaliação plasmática do hormônio anti-mülleriano (HAM) e a contagem de folículos antrais (CFA) como metodologias para selecionar doadoras com melhor resposta na SOV e com alto potencial de produção de embriões, tem ótimas respostas em bovinos e caprinos. Estudos em ovelhas Santa Inês, confirmaram que existe uma correlação forte e positiva, com sensibilidade e especificidade de 86% e 67%, respectivamente, na avaliação do HAM e sensibilidade e especificidade de 89% e 75%, respectivamente, na avaliação do CFA em ovelhas com estro sincronizado para a SOV na primeira aplicação do FSH (PINTO *et al.*, 2018).

Além de todo o controle dos fatores intrínsecos, é importante avaliar também os fatores extrínsecos, como por exemplo, utilizar um protocolo hormonal que tenha resultados satisfatórios.

A utilização da progesterona (P₄) exógena a fim de induzir e sincronizar o ciclo estral é primordial. No início era utilizado o protocolo longo com o uso do implante de P₄ por 12 ou 14 dias (THIBIER E GUÉRIN, 2000) porém, estudos mostram resultados significativos na sua utilização em protocolos curtos com seu emprego intravaginal por 6 dias (FONSECA *et al.*, 2005).

Ainda assim as concentrações séricas de P₄ tendem a diminuir a quantidades subluteais até a retirada do implante (GREYLING *et al.*, 1994) e para contornar essa situação é importante a volta do implante de P₄ no dia 7 (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2002) ou no dia 9 em protocolos curtos de superovulação (THOMPSON *et al.*, 1990) resultando em melhores respostas ovulatórias e de rendimento embrionário (BRASIL, 2013).

De acordo com Mayorga *et al.*, (2011) a não utilização de P₄ exógena, não implica em resultados ruins, pelo contrário, eleva-se a resposta superovulatória e a qualidade embrionária, contanto que inicie a superestimulação com FSH quatro dias após o estro aproveitando as concentrações fisiológicas da progesterona. Contudo é inviável essa utilização em rebanhos grandes, por ter que acompanhar o estro diariamente ou ter que sincronizar as doadoras previamente (BRASIL, 2013).

É importante acrescentar ao protocolo a prostaglandina, pois, em bovinos no tratamento com P₄ exógena e com um CL presente tem um aumento das taxas de P₄ e pulsos de hormônio luteinizante (LH) menores que ocasionam uma diminuição do crescimento folicular e das ovulações (CARVALHO *et al.*, 2008). E em ovinos, acredita-se que o CL cause um efeito inibitório no crescimento de folículos antrais com tamanhos de até 3 mm de diâmetro (BARTLEWSKI *et al.*, 2011).

As gonadotrofinas mais utilizadas para multiplicação folicular são FSH, de origem suína (pFSH) ou ovina (oFSH), gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina menopáusica humana (hMG) (gonadotrofina extraída da urina da mulher na menopausa); as aplicações, as doses e os hormônios utilizados variam nos protocolos e tem demonstrado resultados positivos, onde, as aplicações de FSH (de 6 – 8 administrações) são as mais comuns (COGNIE, 1999; DRIANCOURT, 2001).

De acordo com Cognie (1999) o eCG foi a primeira gonadotrofina a ser utilizada, em dose única de 1000 a 2000 unidades internacionais (UI), um ou dois dias antes da remoção do progestágeno. Porém, esse hormônio em doses elevadas e devido a sua meia-vida longa

aumenta o desenvolvimento de folículos anovulatórios que produzem estradiol em grande quantidade (SILVA *et al.*, 2003) e em decorrência disso, afetam o ambiente uterino dificultando na captação dos ovócitos pelas fímbrias ou seu transporte no útero (MURRAY *et al.*, 1994) e também altere o transporte de espermatozoides ao longo de trato genital feminino, diminuindo a taxa de recuperação (TR) embrionária (EVANS e ARMSTRONG, 1984).

A utilização de anticorpo monoclonal neutraliza o eCG e reduz os efeitos adversos após estimulação folicular (MARTEMUCCI *et al.*, 1995) e administrar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no início da manifestação do estro seria uma alternativa para não usar o anti-eCG (JABBOUR e EVANS, 1991).

Quando foi descoberto a eficiência superior do FSH em relação ao eCG ele foi substituído, primeiro para maiores produções de pFSH (MENCHACA *et al.*, 2009) e em menor escala do oFSH (VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008). Devido a sua meia-vida curta (KANITZ *et al.*, 2002), são necessárias aplicações com intervalos de 12 horas, seis a oito doses, dois a três dias antes da retirada do implante de P₄ (BRASIL, 2013).

A administração das doses decrescentes foi utilizada pela primeira vez por Torrès *et al.*, (1987), obtendo o maior número de ovelhas superovuladas. Assim, utiliza-se uma menor quantidade de FSH administrado ao final do tratamento, diminuindo existência de folículos pré-ovulatórios e ocasionando uma menor atresia de folículos grandes (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2004).

Uma dificuldade no uso do FSH é a variação da quantidade de LH, de lote para lote, pois advém de extratos de pituitária, podendo afetar a resposta ovariana, taxa de fertilização e qualidade embrionária (WU *et al.*, 2011). Além das múltiplas aplicações da gonadotrofina, estando sujeitos a erro de dosagem e no horário da aplicação, e também são elementos de estresse para o animal, dificultando desempenho reprodutivo (SIMONETTI *et al.*, 2008). A simplificação no protocolo necessitaria de mais estudos para se tornar eficiente.

A variabilidade individual do início da manifestação do estro e do momento da ovulação também é observada no tratamento da superovulação que gera uma diminuição nas taxas de fertilização, principalmente na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), produzindo menos embriões transferíveis (THIBIER e GUÉRIN, 2000; VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008). A falta de sincronia no início do protocolo é o principal fator para o aumento de intervalo de tempo entre as ovulações, mas não é o único, ovulações prematuras ou alguns animais que levam muito tempo entre as ovulações (WALKER *et al.*, 1986).

Uma alternativa que diminui a dispersão das ovulações após a superestimulação com FSH (WALKER *et al.*, 1986), reduzindo os folículos anovulatórios e cistos foliculares

(NAQVI e GULYANI 1999), aumentando a taxa de ovulação (AZAWI e AL-MOLA, 2011) e embriões viáveis (MENCHACA *et al.*, 2009) é a utilização do GnRH. Contudo na estação não reprodutiva não foi observado uma melhora na taxa de ovulação e produção de embrião viável (JABBOUR *et al.*, 1996).

Estudos com doses diferentes de GnRH utilizados 24 horas após a remoção da P₄, reduziu o intervalo e o início das ovulações e levou a ovulação de 44-46% das ovelhas, utilizando a dose de 100µg e a ovulação de todos os animais em 34 horas, utilizando a dose de 50µg (WALKER *et al.*, 1986; QUIRKE *et al.*, 1979). Isso demonstra que a utilização do promotor de ovulação é eficiente (BRASIL, 2013).

A raça influencia na resposta superovulatória e produção dos embriões de cada doadora ovina (TORRÈS *et al.*, 1987). As raças mais prolíficas tendem a responder melhor ao estímulo de FSH exógeno (SMITH, 1976). Ammoun *et al.* (2006) explicam essa diferença na resposta por uma variação no crescimento folicular intra-raacial com o uso de FSH, e Dufour *et al.* (2000) dizem que tais diferenças podem estar ligadas com a expressão mais elevada ou com uma maior sensibilidade dos receptores de FSH no ovário.

A regressão prematura de corpo lúteo (RPCL) é associada a superovulação, podendo acontecer em cerca de 40% das ovelhas (SCHIEWE *et al.*, 1991), o que foi observado por Lopes Júnior *et al.*, (2006), na superovulação de ovelhas da raça Morada Nova, com a regressão em 33% das doadoras.

Não se sabe bem a causa da ocorrência desse fenômeno, acredita-se que pode estar associado as altas concentrações de estrógeno circulantes ao longo da fase luteal inicial (FONSECA *et al.*, 2007). Essa condição é acompanhada por uma baixa ou recuperação de embriões de má qualidade (COGNIE *et al.*, 2003) e até mesmo nenhuma recuperação (SCHIEWE *et al.*, 1990)

A RPCL pode ser total ou parcial, pois, existem casos em que se encontram CLs com a coloração e morfologia normal e CLs em regressão e é provável que isso aconteça pela fase em que se olha em relação ao início da luteólise (LOPES JÚNIOR *et al.*, 2006). Por isso, se o momento da realização da laparoscopia for quando o processo luteolítico se inicia, pode-se encontrar CLs morfologicamente normais e alguns com morfologia alterada, embora todos já tenham começado a regressão (SAHARREA *et al.*, 1998).

Segundo Saharrea *et al.*, (1998) a persistência de folículos repletos de estradiol, por volta de três a quatro dias após a superovulação induzem a liberação prematura de agentes luteolíticos, por isso a indução da ovulação de folículos anovulatórios com gonadotrofina coriônica humana (hCG), três dias após o estro diminuem a RPCL em cabras superovuladas. A

redução da RPCL pode ser feita pela administração de agente anti-luteolíticos, por exemplo flunixin meglumina, entre o dia da ovulação e a recuperação dos embriões (BATTYE *et al.*, 1988), por agentes luteotróficos, como a prolactina (FONSECA *et al.*, 2007) ou pela P₄ exógena Sales *et al.*, (2002), além da suplementação alimentar, confirmado por Jabbour *et al.*, (1996), suplementando as doadoras com grãos de tremçoço.

A coleta de embrião em ovelhas, após a SOV, é feita por uma técnica cirúrgica e muito invasiva, semelhante a desenvolvida por Tervit e Havik (1976), onde tem-se a exteriorização completa e manipulação do útero e ovários, causando aderências pós-operatórias. Se realizada como primeira coleta no animal, entre o quinto e sexto dia após a concepção do embrião, recupera-se em torno de 70% de estruturas (TORRÈS E SEVELLEC, 1987).

Contudo, estudos mostram que conforme os animais vão sendo utilizados duas, três ou cinco vezes durante a mesma estação reprodutiva, há uma queda progressiva no número de ovelhas utilizadas e na taxa de ovulação no segundo tratamento. (AL-KAMALI *et al.*, 1985; TORRÈS E SEVELLEC, 1987). Pode-se minimizar essas quedas aumentando o intervalo entre coletas, esperando a total recuperação do animal e permitindo uma gestação por meios naturais (BRASIL, 2013).

Metodologias menos invasivas foram estudadas, diminuindo a formação de aderências permitindo utilizar a doadora em várias coletas, como na técnica totalmente laparoscópica (NELLENSCHULTE E NIEMANN, 1992) ou semi-laparoscópica (BARI *et al.*, 1999), porém os resultados na taxa de recuperação de estruturas são menores quando comparados com a técnica cirúrgica. Ainda assim, um aperfeiçoamento na técnica semi-laparoscópica aumentou a recuperação de 12% dos embriões se assemelhando a técnica cirúrgica e apresentando superioridade em relação a técnica totalmente laparoscópica (BARI *et al.*, 2000).

Além disso, a técnica transcervical, outra metodologia menos invasiva, vem apresentando resultados satisfatórios onde a junção de uma série de fatores como, uma boa contenção (sedação e analgesia), protocolo de dilatação cervical, fixação e transposição cervical, posicionamento do circuito no útero e lavagem uterina efetiva, pode melhorar a taxa de recuperação de embriões pois, o procedimento quando realizado por um profissional treinado dura em torno de 30 minutos por animal chegando a uma reaquisição em torno de 50 a 90% das estruturas (LIMA-VERDE *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2013).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. S. M., LANELLA, P. **Inventário de Recursos Genéticos Animais da Embrapa.** ed. 1, p. 180, Brasília, EMBRAPA, 2017.

ALVAREZ, R. H., FEITOZA, A. S. L. **Transferência de embriões ovinos em condições de campo.** Boletim de Indústria Animal. v. 48, n. 1, p. 7-11, 1991.

AL-KAMALI, A. A. *et al.* **Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotrophin treatment.** Veterinary Record. v. 116, p. 180-181, 1985.

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

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

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

BALARO, M. F. A. *et al.* **Pre-selection test to identify high responder donors goats.** Reproduction Domestic Animal. v. 5, p. 386-391, 2016.

BARI, F. Y. *et al.* **An evaluation of the success of MOET in two breeds of hill sheep maintained under normal systems of hill flock management.** Animal Science. v. 69, p. 367-376, 1999.

BARI, F. Y. *et al.* **Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a moet programme in sheep.** Theriogenology. v. 53, p. 727-742, 2000.

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, 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, 2011.
- BATTYE, K. M. *et al.* **Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*capra hircus*)**. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 84, p. 425-430, 1988.
- BOEF, W. S. (editor), *et al.* **Estratégias de conservação em unidades de produção familiares**. In: Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário. ed. 1 Porto Alegre: L&PM, 2007.
- 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, 2007.
- BRASIL, O. O. **Maior tempo de exposição à progesterona associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos**. 2013, p. 53. (Dissertação de Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- BRASIL, O. O. **Alternativas para o aumento da produção embrionária de ovelhas deslanadas**. 2016, p. 76. (Tese de Doutorado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- BRITO, D.; FONSECA, G. A. B. **Evaluation of minimum viable population size and conservation status of the long-furred woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus*: an endemic marsupial of the Atlantic Forest**. In: BRITO, D.; FONSECA, G. A. B. (eds) *Biodiversity and Conservation*. v. 15, ed. 5, p. 1713–1728, 2006.
- BRITO, N. D. *et al.* **Raça ovina bergamácia brasileira: uma análise do nível de endogamia e da integralidade do pedigree**. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 55: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 28. 2018. Goiânia. *Anais*.
- CARVALHO, J. B. *et al.* **Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers**. *Theriogenology*. v. 69, p. 167-75, 2008.
- CNCFLORA. **Estratégia Nacional para a Conservação Ex Situ de Espécies Ameaçadas da Flora Brasileira**. Rio de Janeiro, p. 6. 2016.
- COGNIE, Y. **State of the art in sheep-goat embryo transfer**. *Theriogenology*. v. 51, p. 105-116, 1999.
- COGNIE, Y. *et al.* **Current status of embryo technologies in sheep and goat**. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- COSTA, G. R. **Padrão de ciclicidade ovariana de ovelhas santa inês e bergamácia criadas no Distrito Federal**. In: Programa de Iniciação Científica - PIC/UniCEUB – Relatórios de Pesquisa. n. 3, Brasília, 2018.

CULLEN JÚNIOR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Educação ambiental e conservação**. In: CULLEN Jr. L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. (eds). Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo silvestre. Paraná: UFPR, 2003.

DESHPANDE, D. *et al.* **Ovarian antral follicular dynamics and serum progesterone concentration during the oestrous cycle of Bannur ewes**. Indian Journal Animal Sciences, v. 69, p. 932- 934, 1999.

DRIANCOURT, D. A. **Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction**. Theriogenology. v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUFOUR, J. *et al.* **Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist**. Journal of Reproduction and Fertility. v. 118, p. 84-95, 2000.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. **Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais**. Revista Archivos de Zootecnia. v. 51, p. 39-52, n. 193-194, 2002.

EMBRAPA. **Relatório de destaques 2016**. Ed. 1. Brasília, 2017. Disponível em: https://issuu.com/embrapa_cenargen/docs/relatorio_destaque2016_embrapargb. Acesso em: 15/01/2020.

EMBRAPA. **Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**. Novo Censo Agropecuário mostra crescimento de efetivo de caprinos e ovinos no Nordeste. Ceará, 2018. Disponível em : <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>> Acesso em: 25/08/2019.

EVANS, A. C. O. **Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep**. Animal Reproduction Science. v. 78, n. 3-4, p. 289-306, 2003.

EVANS, G.; ARMSTRONG D. T. **Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments**. Journal of Reproduction and Fertility. v. 70, p. 47-53. 1984.

FONSECA, J. F. *et al.* **Resposta superovulatória em cabras Saanen lactantes utilizando curtos protocolos de exposição à progesterona e somatotropina bovina recombinante (rbST)**. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 19. Acta Scientiae Veterinariae. v. 33, p. 243 2005. Anais.

FONSECA, J. F. **Bioteχνologias da reprodução em ovinos e caprinos**. ed. 1, p. 30, Sobral, EMBRAPA, 2006.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI, J. H. **Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos**. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG, II. 2007. Pampulha. Anais.

FONSECA, J. F. *et al.* **Embryo production and recovery in goats by nonsurgical transcervical technique**. Small Ruminant Research. v. 111, p. 96-99, 2013.

FONSECA, J. F. *et al.* **Bioteecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos.** ed. 1, p. 108, Brasília, EMBRAPA, 2014.

GINTHER, O. J.; KOT, K. **Follicular dynamics during the ovulatory season in goats.** *Theriogenology*, v. 42, p. 987-1001, 1994.

GONZALEZ-BULNES, A. *et al.* **Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes.** *Reproduction Domestic Animal*, v.35, p.65-68, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A. *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, p. 1607-1614, 2002.

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.

GREYLING, J. P. C. *et al.* **Synchronization of oestrus in sheep: use of different doses of progestagen outside the normal breeding season.** *South African Journal of Animal Science*. v. 24, p.33–37, 1994.

HENSON, E. L. **Animal Genetic Resources.** In: HENSON, E. L. (eds). *In situ conservation of livestock and poultry.* FAO Animal Production and Health Paper 99, 2004.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal.** 2011. Sistema IBGE de recuperação automática-SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P> Acesso em: 25/08/2019.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2017.** v. 45 p. 1-8. Rio de Janeiro. 2017

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

JABBOUR, H. N. *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, p. 699-707, 1996.

KANITZ, W. *et al.* **Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination.** *Reproduction Nutrition Development*. v. 42, p. 587-599. 2002.

LEDDA, S., GONZALEZ-BULNES, A. **ET-Technologies in Small Ruminants.** In: Niemann H, Wrenzycki C. (eds). *Animal Biotechnology 1*. v. 1. Alemanha: Springer Cham, 2018.

LIMA-VERDE, J. B. *et al.* **Transcervical embryo recovery in Saanen goats.** *South African Journal Animal Science*. v.33, p.127-131, 2003.

- LOPES JÚNIOR, E. S. *et al.* **Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil.** *Tropical Animal Health and Production.* v. 38, p. 555-561, 2006.
- LOPES JÚNIOR, E. S.; MIRANDA, M. S.; SILVA, A. A. A. **Múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos.** *Acta Veterinaria Brasilica,* v.8, p. 351-360, 2014.
- MACEDO, F. A. F. *et al.* **Desenvolvimento de cordeiros puros e cruzados terminados em pastagem ou confinamento.** In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 33, 1996. Fortaleza. *Anais.*
- MACHADO, T. M. M. **Raças raras de pequenos ruminantes no Brasil.** *Revista Ação Ambiental.* v.3, n.15, p.19-23, 2001.
- MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil.** ed. 1, p. 232, Brasília, EMBRAPA, 2000.
- MARIANTE, A. S. *et al.* **Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil.** *Livestock Science.* v. 120, p. 204–212, 2009.
- MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. **Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.
- MARTEMUCCI, G. *et al.* **Embryo production and endocrine response in the ewe superovulated with PMSG with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times.** *Theriogenology.* v. 44, p. 691-703. 1995.
- MARTINS, E. C. *et al.* **Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura.** *Ativos Ovinos e Caprinos,* v. 2, p. 3-6, 2016.
- MAYORGA, I. *et al.* **Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices.** *Theriogenology.* v. 75, p. 1661–1668, 2011.
- MCMANUS, C. *et al.* **Curvas de crescimento de ovinos Bergamácia criados no Distrito Federal.** *Revista Brasileira de Zootecnia.* v. 32, n. 5, 2003.
- MCMANUS, C. *et al.* **Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation.** *Brazilian Journal of Science and Technology* v. 1, n. 3, p. 1-15, 2014a.
- MCMANUS, C. *et al.* **Distribuição geográfica de raças de ovinos no Brasil e sua relação com fatores ambientais e climáticos, como a classificação de risco para a conservação.** *Bagé: ARCO.* p. 27, 2014b.
- MENCHACA, A. *et al.* **Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep.** *Theriogenology.* v. 72, p. 477-483, 2009.
- MIRANDA, R. M.; MCMANUS, C. **Desempenho de ovinos bergamácia na região de Brasília.** *Revista Brasileira de Zootecnia,* v. 29, n 6, 2000.

- MONNIAUX, D. *et al.* **Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat.** *Reproduction*. v.142, p. 845-854, 2011.
- MORAES, O. R. O. **O melhoramento genético dos ovinos.** In: PEREIRA, J. C. C. (eds). *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal*. Minas Gerais: Belo Horizonte, FEPMUZ, 2012.
- 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, 2007.
- MURRAY, J. F. *et al.* **Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus.** *Theriogenology*. v. 42, p. 1337-1347. 1994.
- NAQVI, S. M. K.; GULYANI, R. **Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions.** *Small Ruminant Research*. v. 34, p. 127-131, 1999.
- NELLENSCHULTE, E.; NIEMANN, H. **Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy.** *Animal Reproduction Science*. v. 27, p. 293-304, 1992.
- OKLAHOMA STATE UNIVERSITY. **Breeds of Livestock.** 2012. Disponível em: <http://afs.okstate.edu/breeds/sheep>. Acesso em: 19/08/2019.
- PAIVA, S. *et al.* **Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 40, p. 887-893, 2005.
- PINTO, P. H. N., *et al.* **Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests.** *Theriogenology*. v. 113, p. 146-152, 2018.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Conservação de Populações e espécies.** In: PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. (eds). *Biologia da conservação*. Londrina: Planta, 2001.
- QUIRKE, J. R. *et al.* **Oestrus, time of ovulation, ovulation rate and conception rate in progestagen-treated ewes given Gn-RH, Gn-RH analogues and gonadotrophins.** *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 56, p. 479-188, 1979.
- SAHARREA, A. *et al.* **Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase.** *Theriogenology*. v. 50, p. 1039-1052, 1998.
- SALES, H. O. *et al.* **Manual de transferência de embriões em caprinos.** p. 40, Sobral, EMBRAPA, 2002.
- SANTOS, L. T. A. **Caracterização Morfométrica de Ovinos da Raça Bergamácia Brasileira.** 2019, p. 74. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2019.

SCHIEWE, M. C. *et al.* **Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2alpha synchronization is compromised by premature luteal regression.** *Theriogenology*. v. 34, p. 469-486, 1990.

SCHIEWE, M.C. *et al.* **Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandinF2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep.** *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 93, p. 19-30, 1991.

SILVA, J. C. *et al.* **Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons.** *Theriogenology*. v. 60, p. 521-532. 2003.

SILVA, L. S. A., *et al.* **Growth curve in Santa Inês sheep.** *Small Ruminant Research*. v. 105, p. 182-185, n. 1-3, 2012.

SIMONETTI, L. *et al.* **Simplified superovulatory treatments in corriedale ewes.** *Animal Reproduction Science*. v. 104, p. 227-237. 2008.

SMITH, J. F. **Selection for fertility and response to PMSG in Romney ewes.** *Proceedings: New Zealand Society of Animal Production*. v. 36, p. 247-251, 1976.

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, 1999.

TERVIT, H. R.; HAVIK, P. G. **A modified technique for flushing ova from the sheep uterus.** *New Zealand Veterinary Journal*. v. 24, p. 138-140, 1976.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. **Embryo transfer in small ruminants: The method of choice for health control in germplasm exchanges.** *Livestock Production Science*. v. 62, p. 253-270, 2000.

THOMPSON, J. G. E. *et al.* **The application of progesterone-containing CIDRTM devices to superovulated ewes.** *Theriogenology*, v. 33, n. 6, p. 1297-1304, 1990.

TORRÈS, S.; COGNIE, Y.; COLAS, G. **Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P.** *Theriogenology*. v. 27, p. 407-419, 1987.

TORRÈS, S.; SEVELLEC, C. **Repeated superovulation and surgical recovery os embryos in the ewe.** *Reproduction Nutrition Development*. v. 27, n. 4, p. 859-863, 1987.

VAZ, C. M. S. L. **Melhoramento Genético.** In: VAZ, C. M. S. L. (eds). *Coleção 500 perguntas 500 respostas*. ed. 1, p. 47. EMBRAPA, Brasília, 2007.

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, 2008.

VIANA, J. G. A. **Panorama Geral da Ovinocultura no mundo e no Brasil.** Revista ovinos, v. 4, n. 12, p. 1-9, 2008.

VIEIRA, G. V. N. **Criação de ovinos.** ed. 2, p. 371, São Paulo: Melhoramentos, 1967.

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

WU, W. *et al.* **Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep.** African Journal of Biotechnology. v. 10, n.70, p. 15834-15837, 2011.

CAPÍTULO 2

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA BRASILEIRA

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas Bergamácia Brasileira e relacioná-las com a condição folicular antes do tratamento superovulatório, como referência para seleção de doadoras com potencial para superovulação. Vinte e três ovelhas foram avaliadas quanto a população folicular por ultrassonografia na fase de metaestro do ciclo estral e divididas em grupos com baixa, média e alta população folicular. Posteriormente foram sincronizadas, superovuladas com 133mg de pFSH, acasaladas e submetidas a coleta de embriões. A resposta superovulatória ($9,0\pm 3,3$ vs $10,7\pm 6,2$ vs $13,8\pm 7,1$) e produção embrionária ($4,0\pm 3,8$ vs $2,6\pm 2,0$ vs $1,8\pm 4,0$) foram semelhantes entre os grupos ($P>0,05$). Houve correlação positiva entre o número de folículos no metaestro e o número de corpos lúteos com regressão prematura (RPCL) (0,52) e correlação negativa entre a taxa de recuperação e RPCL (-0,44) ($P<0,05$). As ovelhas que apresentaram RPCL tiveram mais folículos no metaestro ($16,9\pm 7,8$ vs $12,7\pm 3,2$) e menor taxa de recuperação embrionária ($38,8\pm 29,3$ vs $72,2\pm 29,9$) do que as que apresentaram CLs funcionais ($P<0,05$). A quantificação folicular nas fases de metaestro não foi capaz de identificar doadoras com alto potencial de produção embrionária. Animais com RPCL tiveram maior população folicular no metaestro e menor recuperação de embriões.

Palavras chaves: Bergamácia Brasileira, embriões, população folicular, seleção de doadoras, superovulação.

2. ABSTRACT

The objective was to quantify the superovulatory response and embryonic production of Brazilian Bergamacia sheep and to relate them to the follicular condition before superovulatory treatment, as a reference for selection of donors with potential for superovulation. Twenty-three sheep were evaluated for the follicular population by ultrasound in the metestrus phase of the

estrous cycle and divided into groups with low, medium and high follicular population. Subsequently, they were synchronized, superovulated with 133mg of pFSH, mated and subjected to embryo collection. The superovulatory response (9.0 ± 3.3 vs 10.7 ± 6.2 vs 13.8 ± 7.1) and embryonic production (4.0 ± 3.8 vs 2.6 ± 2.0 vs 1.8 ± 4.0) were similar between groups ($P>0.05$). There was a positive correlation between the number of follicles in the metestrus and the number of corpus luteum with premature regression (PLR) (0.52) and a negative correlation between the recovery rate and PLR (-0.44) ($P<0.05$). The sheep that presented PLR had more follicles in the metestrus (16.9 ± 7.8 vs 12.7 ± 3.2) and a lower embryo recovery rate (38.8 ± 29.3 vs 72.2 ± 29.9) than those with functional CLs ($P<0.05$). Follicular quantification in the metestrus phases was not able to identify donors with high potential for embryonic production. Animals with PLR had a larger follicular population in the metestrus and less embryo recovery.

Keywords: Brazilian Bergamasca, embryos, follicular population, donor selection, superovulation.

3. INTRODUÇÃO

A superovulação ovina consiste na estimulação ovariana por meio de protocolo hormonal para a sincronização do estro e da ovulação com a finalidade do desenvolvimento e da maturação de uma quantidade elevada de folículos simultaneamente, por isso, se tornou uma biotecnologia da reprodução importante para multiplicação de raças ovinas que se encontram ameaçadas de extinção (LOPES JÚNIOR *et al.*, 2014), principalmente em raças localmente adaptadas, como por exemplo a Bergamácia Brasileira.

São ovelhas criadas em núcleos de conservação de recursos genéticos animais que utilizam a conservação *ex situ in vitro* com técnicas modernas de criopreservação de

material genético como sêmen, ovócitos e embriões para serem armazenados em bancos de germoplasma animal (MARIANTE *et al.*, 2011). Dentre o material genético a ser armazenado, embriões são estratégicos por permitirem a reintrodução de uma raça eventualmente extinta em uma única geração.

A eficiência nos tratamentos hormonais em programas de SOV ovina consiste em uma compreensão das funções e inter-relações da foliculogênese, crescimento do folículo, maturação do ovócito, ovulação e fertilização (GIBBONS *et al.*, 2011). Porém, empecilhos ainda são detectados na uniformidade da resposta superovulatória para a recuperação de embriões viáveis (BARTLEWSKI *et al.*, 2016), pois, a resposta ovariana em ovelhas superovuladas depende de algumas condições (AMIRIDIS e CSEH, 2012), onde os fatores intrínsecos ainda são os principais responsáveis por essa variabilidade na resposta superovulatória (BRASIL, 2016). E segundo Bruno-Galarraga *et al.* (2014) existe ainda uma repetibilidade intrínseca individual após superovulações consecutivas.

Estudos mostraram que a resposta ovariana está associada as características do ovário no início da superovulação onde a presença de um folículo grande afeta negativamente a taxa de ovulação e a quantidade de embriões viáveis (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2000;

GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2002; VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2005; MOSSA *et al.*, 2007). Além disso, a maioria desses estudos registram que a quantidade de folículos pequenos está fortemente relacionada com o índice de ovulações e a quantidade de embriões viáveis recuperados (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2000; GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2002; MOSSA *et al.*, 2007).

No entanto, em ovelhas, a avaliação de folículos antrais correlacionados com a produção de CL após a SOV não está bem estabelecida (BARTLEWSKI *et al.*, 2008). Estudos realizados com ovelhas Santa Inês propuseram correlacionar a população folicular das ovelhas em diferentes fases do ciclo estral (pró-estro, estro, metaestro e diestro) com a resposta superovulatória e obteve resultados bastantes satisfatórios na fase de metaestro, demonstrando ser uma abordagem possível para a seleção de doadoras de embriões (BRASIL, 2016).

A evolução de metodologias para a pré-seleção de ovelhas doadoras de embriões, principalmente as localmente adaptadas ameaçadas de extinção, com capacidade elevada para responder a protocolos de superovulação é de suma importância para diminuir os custos com protocolos hormonais e evitaria cirurgias desnecessárias em ovelhas não responsivas a superovulação. Portanto, objetivou-se avaliar se a população folicular, em ovelhas da raça Bergamácia Brasileira, em duas etapas (na fase de metaestro e no início da SOV) estão correlacionadas com a resposta superovulatória e o rendimento embrionário.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este Experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob protocolo CEUA/Cenargen 007/2019.

4.1 Local do experimento e animais

O estudo foi realizado no mês de julho de 2020 no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira pertencente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado a sudoeste da cidade de Brasília-DF, com altitudes que variam de 1050 a 1250 metros. O clima predominante é o tropical chuvoso, indicando inverno seco e verão chuvoso. Essa região apresenta um clima tropical chuvoso, com invernos secos e verões chuvosos, tipo AW pela classificação de Köppen (ALVARES *et al.*, 2013).

Foram utilizadas 23 fêmeas ovinas adultas da raça Bergamácia Brasileira, sexualmente maduras e clinicamente saudáveis, com idade entre 2 e 3 anos e ECC entre 2,5 e 3 (intervalo 1-5; THOMPSON e MEYER, 1994). As ovelhas foram mantidas em 5 por baia de confinamento e alimentadas com feno de Tifton e ração balanceada (300g/ovelha/dia), com acesso ilimitado à água e sal mineral.

4.2 Delineamento experimental e avaliação ultrassonográfica

Todas as ovelhas tiveram o estro sincronizado pela administração intramuscular (IM) de duas doses de 250 µg de D-cloprostenol sódico (Clocio®, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A.) com intervalo de 10 dias entre as aplicações e quatro dias e meio após a última aplicação de D-cloprostenol, momento correspondente a fase do ciclo estral do metaestro, foram realizados exames ultrassonográficos para quantificação dos folículos ≥ 2 mm (BRASIL, 2016), e de acordo com o número de folículos visualizados em cada ovário, foi feita a média \pm desvio padrão e foram separadas em grupos de alta (≥ 18 folículos; G1META), média ($>10 < 18$ folículos; G2META) e de baixa população folicular (≤ 10 folículos; G3META)

Após essa avaliação, os animais foram submetidos ao protocolo de superovulação e no D4, tempo correspondente ao início da SOV, também foram realizados exames ultrassonográficos para quantificação dos folículos ≥ 2 mm e de acordo com o número de folículos visualizados em cada ovário, foi feita a média \pm desvio padrão e foram separadas em grupos de alta (≥ 15 folículos; G1SOV), média ($>8 < 15$ folículos; G2SOV) e baixa população folicular (≤ 8 folículos; G3SOV).

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 contidas na posição de estação em um tronco de contenção enquanto eram submetidas a exame de ultrassonografia. Esta técnica foi validada para o monitoramento da dinâmica folicular ovariana e detecção de CL em ovinos (VINOLES *et al.*, 2004).

4.3 Protocolo de superovulação e coleta de embriões

As ovelhas foram sincronizadas com protocolo curto e com a inserção (dia 0) de um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) por 7 dias, uma aplicação IM de 250 µg de D-cloprostenol sódico (Clocio®, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A.). No dia 4, a superestimulação foi induzida com aplicação IM de 133mg de pFSH (Folltropin®-V, Tecnopec, AHC Inc., Bioniche, Canadá) em oito doses decrescentes (20% x 2; 15% x 2; 10% x 2; 5% x 2) com intervalo de 12 horas. O dispositivo de progesterona foi retirado juntamente com a aplicação da sétima dose de FSH. Uma dose de 250 µg de D-cloprostenol sódico

(Clocio®, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A.) e de GnRH (25 µg de acetato de gonadorelina; Gestran Plus, Tecnopec, ARSA SRL, Argentina) foi administrada IM junto com a quinta e oitava injeção de pFSH, respectivamente.

As ovelhas foram distribuídas em 5 baias para a monta natural (MN) 36 horas após a retirada do CIDR e mantidas por 24 horas. Ao final da MN o CIDR foi recolocado. Os carneiros tiveram os exames andrológicos avaliados anteriormente. No quinto dia após a MN, o número de ovulações foi verificado por procedimento laparoscópico. As ovelhas com <3 CL foram consideradas como fêmeas não responsivas a superovulação e não foram coletadas.

As doadoras superovuladas foram anestesiadas com xilazina (0,10mg/kg IM; Rompun®, Bayer, Brasil) e cloridrato de cetamina (3,5mg/kg por via intravenosa; Ketamina, Agener, Brasil). Além disso, foi administrada anestesia local na região da incisão cirúrgica (10mL de lidocaína; Lidovet®, Bravet, Brasil). Os ovócitos/embriões foram coletados cirurgicamente após laparotomia ventral, através de uma incisão paramediana (5cm de comprimento) cranial ao úbere, para acessar o trato reprodutivo.

Cada corno uterino foi lavado com 60mL de meio de recuperação de embriões (DPBS, Cultilab, Brasil), pré-aquecido a 37°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), seguindo os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW, 1998).

Os embriões que desenvolveram as 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 e com grau 1 a 2 congeláveis.

4.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sistema para Análises Estatísticas (SAEG; Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007), com a finalidade de aplicação de testes paramétricos e não paramétricos para a análise dos resultados, com diferenças consideradas significativas quando o $P \leq 0,05$. Para avaliação quanto a normalidade foi utilizando o teste de Lilliefors. O ANOVA foi utilizado para os resultados da

avaliação folicular no metaestro o número de corpos lúteos, estruturas totais e taxa de recuperação e suas médias comparadas pelo teste de Tukey. Os parâmetros embrionários – embriões viáveis, congeláveis, degenerados e o RPCL não apresentaram distribuição normal e foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Além disso, correlações de Spearman foram realizadas entre os parâmetros de avaliação ovariana, resposta superovulatória e da produção de embriões das doadoras.

5. RESULTADOS

No tratamento superovulatório, a coleta de embrião só foi realizada em ovelhas que apresentaram ≥ 3 CLs ou RPCLs, por isso, 4 ovelhas não foram coletadas (17,39%), pois não foram consideradas responsivas ao tratamento. Obtivemos como média geral 82,61% (19/23 ovelhas) de resposta superovulatória positiva, com 217 estruturas contadas nos ovários, entre CLs e RPCLs. Pela produção embrionária tivemos 52,10% (113/217 estruturas) das estruturas totais recuperadas com 46,20% de embriões viáveis ($2,26 \pm 2,95$).

As avaliações foliculares na fase de metaestro (FOLM) e no início na superovulação (FOLS), mostraram que a maioria das ovelhas, 53% (12/23) e 65% (15/23), se enquadravam no intervalo médio de folículos ($>10 < 18$ de folículos) e ($>8 < 15$ de folículos), respectivamente, porém o número de folículos no metaestro foi maior no G1META do que nos grupos G2META e G3META ($P < 0,05$). As variáveis que quantificaram a resposta superovulatória e a produção embrionária foram semelhantes ($P > 0,05$; 19 ovelhas responsivas ao protocolo) entre os grupos com alta, média e baixa população folicular no metaestro, apesar do G3META ter mostrado resultados em relação ao RPCL ($2,8 \pm 6,3$ x $4,9 \pm 6,2$ x $12,8 \pm 8,8$) e taxa de recuperação ($77,4 \pm 16,4$ x $50,9 \pm 35,3$ x $38,4 \pm 35,7$) melhores do que no G2META e G1META respectivamente. No FOLS não houve diferença significativa ($P > 0,05$). (Tabela 1)

Tabela 1. Resposta ovariana e produção embrionária (média \pm desvio padrão) de ovelhas Bergamácia Brasileira com baixa (G3META), média (G2META) e alta (G1META) população folicular na fase de metaestro submetidas ao protocolo de superovulação.

	G3META (n=5)	G2META (n=9)	G1META (n=5)
FOLM	9,6 \pm 0,5 ^C	14,8 \pm 1,5 ^B	20,4 \pm 2,3 ^A
FOLS	11,6 \pm 5,8	12,7 \pm 3,5	11,0 \pm 7,1
Corpos lúteos	9,0 \pm 3,3	10,7 \pm 6,2	13,8 \pm 7,1
RPCL	2,8 \pm 6,3	4,9 \pm 6,2	12,8 \pm 8,8
Estruturas totais	6,6 \pm 1,3	5,4 \pm 4,9	6,2 \pm 6,7
Embriões viáveis	4,0 \pm 3,8	2,6 \pm 2,0	1,8 \pm 4,0
Embriões congeláveis	3,0 \pm 2,8	2,0 \pm 1,8	1,6 \pm 3,6
Taxa de recuperação (%)	77,4 \pm 16,4	50,9 \pm 35,3	38,4 \pm 35,7

^{A, B, C} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (Anova, Tukey; $P < 0,05$).

Avaliação de folículos no metaestro (FOLM) e no primeiro dia da SOV (FOLS).

Regressão prematura de corpo lúteo (RPCL).

Houveram correlações positivas ($P < 0,05$) entre o número de folículos no metaestro e o número de corpos lúteos com regressão prematura; entre o número de corpos lúteos e estruturas totais recuperadas; entre o número de corpos lúteos e RPCL; entre a taxa de recuperação e o número de estruturas totais e embriões viáveis; entre embriões degenerados e número de corpos lúteos e estruturas totais recuperadas. Houve correlação negativa ($P < 0,05$) entre a taxa de recuperação e regressão prematura do corpo lúteo (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação de Pearson (valor r) entre a população folicular e a produção embrionária de ovelhas Bergamácia Brasileira submetidas a protocolo de superovulação.

	FOLM	FOLS	CL	ESTT	TXREC	EMBV	EMBC	DEG	RPCL
FOLM	1	0,13	0,26	-0,14	-0,29	-0,19	-0,18	0,34	0,52*
FOLS		1	0,11	-0,01	-0,04	-0,03	0,03	0,31	0,00
CL			1	0,53*	-0,13	0,26	0,25	0,41*	0,66**
ESTT				1	0,66**	0,49*	0,46*	0,42*	0,03
TXREC					1	0,43*	0,42*	0,09	-0,44*
EMBV						1	0,98	-0,08	0,15
EMBC							1	-0,08	0,16
DEG								1	0,37
RPCL									1

Asteriscos indicam correlações significativas (Correlação de Pearson; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Avaliação de folículos no metaestro (FOLM) e no primeiro dia da SOV (FOLS).

Corpos lúteos (CL). Estruturas totais (ESTT). Taxa de recuperação (TXREC).

Embriões viáveis (EMBV), congeláveis (EMBC) e degenerados (DEG).

Regressão prematura de corpo lúteo (RPCL).

Quando os animais foram divididos em dois grupos que sofreram ou não regressão prematura de corpo lúteo, aqueles animais que apresentaram RPCL tiveram maior número de folículos no metaestro e menor taxa de recuperação ($P < 0,05$). O número de folículos no início da SOV, corpos lúteos, estruturas totais, embriões viáveis e embriões congeláveis foram semelhantes nas ovelhas com ou sem RPCL ($P > 0,05$).

Tabela 3 - Resposta ovariana e produção embrionária (média \pm desvio padrão) de ovelhas Bergamácia Brasileira com e sem regressão precoce do corpo lúteo (RPCL) submetidas a protocolo de superovulação.

	Sem RPCL (n=9)	Com RPCL (n=10)
Folículos no metaestro	12,7 \pm 3,2 ^B	16,9 \pm 7,8 ^A
Folículos na SOV	11,6 \pm 4,1	12,3 \pm 3,5
Corpos lúteos	8,7 \pm 6,0	13,2 \pm 5,0
Estruturas totais	6,2 \pm 4,6	5,7 \pm 4,9
Embriões viáveis	2,6 \pm 3,1	2,9 \pm 3,2
Embriões congeláveis	2,0 \pm 2,4	2,3 \pm 2,7
Taxa de recuperação (%)	72,2 \pm 29,9 ^A	38,8 \pm 29,3 ^B

^{A, B} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (Teste t; $P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente experimento foi avaliada resposta superovulatória e a produção embrionária de ovelhas da raça Bergamácia Brasileira e procurou-se associar essa resposta a metodologias para a seleção de doadoras de alto potencial de embriões ovinos.

A resposta superovulatória foi bastante satisfatória, onde 82,61% das ovelhas responderam ao tratamento superovulatório, o que se assemelha ao encontrado por Menchaca *et al.*, (2007) (88% em cabras Alpinas); Menchaca *et al.* (2009) (100% em ovelhas Merinos), Neves *et al.* (2010) (94% em ovelhas Santa Inês) e Brasil (2013) (84,6% em ovelhas Santa Inês). Existem trabalhos onde de 20 a 40% das ovelhas não responderam ao tratamento superestimulatório (D'ALESSANDRO *et al.*, 1996; CORDEIRO *et al.*, 2003). Esses resultados mostram a potencialidade das ovelhas Bergamácia Brasileira na utilização de ferramentas de reprodução assistida como a superovulação e a coleta de embrião para dar suporte a programas de conservação e melhoramento animal.

A taxa de recuperação (TR) total (52,10%) foi considerada adequada quando se utiliza o método cirúrgico para a colheita de embrião. Taxas um pouco superiores foram alcançadas por Lima *et al.*, (2012) (63,8% em ovelhas Santa Inês) e Brasil (2016) (66% em ovelhas Santa Inês) podendo ser um padrão para melhorar os resultados de produção embrionária alcançados com a raça Bergamácia em futuros trabalhos.

De acordo com Torrès e Sevellec, (1987), a TR pode ser influenciada por coletas realizadas anteriormente e que podem causar aderências no trato reprodutivo da fêmea, dificultando a captura dos ovócitos pelas fimbrias ou o deslocamento dos embriões e espermatozoides no útero. Técnicas menos invasivas, como a colheita de embrião transcervical, vem mostrando resultados positivos, chegando a uma recuperação de até 90% das estruturas (LIMA-VERDE *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2013), tendo potencial para aumentar mais a TR em novos trabalhos.

Segundo Bartlewski *et al.* (2016) a variabilidade na resposta superovulatória ainda é considerada crítica e está associada a fatores intrínsecos (raça, população folicular) e extrínsecos (hormônio, dose e protocolo, método de inseminação e intervalo entre tratamentos) (AMIRIDIS e CSEH, 2012). 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 (BRASIL, 2016).

Dentre os principais fatores intrínsecos que influenciam a resposta superovulatória e produção de embriões está o desenvolvimento folicular das doadoras. Alguns estudos têm sugerido que a resposta superovulatória e a produção embrionária está positivamente correlacionada com população folicular ovariana (número de folículos ≥ 2 mm) durante a fase de metaestro (BRASIL, 2016) e no início do tratamento superestimulatório (primeira aplicação de FSH) (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2002; MOSSA *et al.*, 2007). Entretanto, existem estudos que não verificaram essa correlação (BRUNO-GALARRAGA *et al.*, 2014).

Os resultados deste estudo mostraram que uma simples análise ultrassonográfica não foi eficiente, quantificando a população folicular ≥ 2 mm em duas fases distintas, em prever a capacidade de resposta a superovulação para selecionar ovelhas doadoras com alta produção de embriões *in vivo*. No FOLM a correlação só foi verificada com a RPCL e no FOLS não houve correlação com nenhuma das variáveis. Quando os animais foram divididos em grupos com alta, média e baixa população folicular os resultados da resposta superovulatória e rendimento embrionário confirmaram as correlações observadas em cada etapa de contagem de folículos.

Contudo, metodologias estão sendo estudadas para selecionar ovelhas com maior potencial para produção de embriões *in vivo*, sendo uma alternativa viável para estudos futuros com a Bergamácia Brasileira, a fim de se encontrar resultados mais satisfatórios. Pinto *et al.* (2018), comprovaram, em ovelhas Santa Inês, que a contagem de CFA e a dosagem plasmática do HAM são eficientes em definir doadoras com elevadas taxas de recuperação de embriões após um protocolo de sincronização de estro.

A RPCL é considerada um problema inerente a produção *in vivo* de embriões da espécie ovina, tendo ocorrência entre 20 a 40% podendo chegar até a 75% das ovelhas em protocolos de SOV como demonstrado por Lopes Júnior *et al.* (2006) e Oliveira *et al.* (2013), resultando na recuperação de embriões de baixa qualidade ou mesmo nenhuma recuperação (SCHIEWE *et al.*, 1991; COGNIE, 1999).

Em nosso estudo 57,9% das ovelhas apresentaram a RPCL e apenas 31,5% produziram embriões viáveis ($2,9 \pm 3,2$; $P > 0,05$). Houve uma correlação negativa da RPCL com a taxa de recuperação embrionária, o que interferiu na média de embriões recuperados. Além disso, o número de RPCL teve correlação positiva com o número de folículos no metaestro fazendo com que a média de embriões viáveis tenha sido numericamente inferior nas ovelhas com maior população folicular do que naquelas com menor número de folículos no metaestro ($1,8 \pm 4,0$ vs $4,0 \pm 3,8$, respectivamente, $P > 0,05$). Esta resposta inesperada deve ter contribuído de forma importante para que os animais com maior população folicular não tenham tido uma melhor produção embrionária e também correlações positivas entre RPCL e CL foram encontradas.

Na tentativa de contornar esse efeito, todas as ovelhas doadoras de embriões tiveram um CIDR de segundo uso introduzido após a MN, conforme o proposto por Fonseca (2005). Brasil (2016), mesmo recolocando um CIDR de segundo uso após a IA, também registrou aparecimento de RPCL em ovelhas Santa Inês após a SOV, porém em uma quantidade menor (32% das ovelhas). Estudos com ovelhas Santa Inês mostraram que utilizando o protocolo “Dia 0” colocando um segundo implante vaginal com progesterona inserido 12h antes do início da SOV e removido no final da SOV pode-se observar que nenhum animal apresentou RPCL (MENEZES, 2014).

Além disso, foi-se utilizado o GnRH 12h após a retirada do CIDR, onde segundo Menchaca *et al.* (2010) tem o propósito de inibir a luteólise precoce, ou seja, a RPCL, agindo na indução da ovulação acarretando a diminuição dos níveis séricos de estrógeno e inibindo a ação das prostaglandinas, com o propósito da redução do RPCL, entretanto, nenhuma dessas abordagens impediram o aparecimento da RPCL nas doadoras que mesmo assim foram recuperados embriões viáveis apesar da TR ter sido menor, indicando que a raça Bergamácia Brasileira necessita de mais estudos para definir protocolos de SOV que melhore mais a resposta embrionária.

7. CONCLUSÃO

A Bergamácia Brasileira tem um grande potencial para ser utilizada em programas de reprodução assistida como a superovulação e a coleta de embrião, tendo uma resposta superovulatória satisfatória e uma taxa de recuperação adequada, porém, a quantificação folicular nas fases de metaestro e no início da superovulação não foram capazes de selecionar doadoras com alto potencial de produção de embriões ovinos, necessitando de mais estudos para expressar toda a sua capacidade. A RPCL, independentemente da utilização de estratégias para evitar sua ocorrência, teve expressivo aparecimento, tendo uma menor taxa de recuperação de embriões, porém com embriões viáveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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, 2008.

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, p. 130-143, 2016.

BRASIL, O. O. **Maior tempo de exposição à progesterona associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos**. 2013, p. 53. (Dissertação de Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BRASIL, O. O. **Alternativas para o aumento da produção embrionária de ovelhas deslanadas**. 2016, p. 76. (Tese de Doutorado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília, 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, 2014.

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

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

D'ALESSANDRO, A. *et al.* **Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH.** *Small Ruminant Research*. v. 19, p. 255-261, 1996.

FONSECA, J. F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos.** Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16. 2005. Goiânia. Anais: Palestras.

FONSECA, J. F. *et al.* **Embryo production and recovery in goats by nonsurgical transcervical technique.** *Small Ruminant Research*. v. 111, p. 96-99, 2013.

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

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, 2002.

GONZALEZ-BULNES, A. *et al.* **Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes.** *Reproduction Domestic Animal*, v.35, p.65-68, 2000.

LIMA, J. T. M. *et al.* **Taxa de recuperação de estruturas em ovelhas da raça Santa Inês após protocolo de superovulação.** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, XXVI. Foz do Iguaçu, 2012. Resumos.

LIMA-VERDE, J. B. *et al.* **Transcervical embryo recovery in Saanen goats.** South African Journal Animal Science. v.33, p.127-131, 2003.

LOPES JÚNIOR, E. S.; MIRANDA, M. S.; SILVA, A. A. A. **Múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos.** Acta Veterinaria Brasilica, v.8, p. 351-360, 2014.

LOPES JÚNIOR, E. S. *et al.* **Influência dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca).** Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, p. 510, 2006.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. **Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.

MENCHACA, A. *et al.* **New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants.** Reproduction, Fertility and Development, v. 22, 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, p. 477-483, 2009.

MENCHACA, A. *et al.* **Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the shortterm protocol to synchronize ovulation in goats.** Animal Reproduction Science, v. 102, p. 76–87, 2007.

MENEZES, D. C. R. **Avaliação de protocolos para superovulação ovina.** 2014, p. 85. (Tese de doutora em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

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, 2007.

NEVES, J. P.; RAMOS, A. F.; SILVA, B. D. M. **Alternatives to estrus synchronization and superovulation in ewes in the tropics.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 38, p. 337-369, 2010.

OLIVEIRA, M. E. F.; BARTLEWSKI, P. M.; FELICIANO, M. A. R. **Controle do ciclo estral**. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. (eds). *Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos*. p. 71-89. São Paulo: MedVet, 2013.

PINTO, P. H. N., *et al.* **Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests**. *Theriogenology*. v. 113, p. 146-152, 2018.

SCHIEWE, M.C. *et al.* **Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandinF2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep**. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 93, p. 19-30, 1991.

STRINGFELLOW, D. A. **Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo**. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (eds.). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. SBTE, Jaboticabal, p. 83-96, 1998.

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: 05/10/2019.

TORRÈS, S.; SEVELLEC, C. **Repeated superovulation and surgical recovery os embryos in the ewe**. *Reproduction Nutrition Development*. v. 27, n. 4, p. 859-863, 1987.

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, 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, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Bergamácia Brasileira é uma raça localmente adaptada com capacidade de alcançar resultados elevados em programas de superovulação em prol da multiplicação de indivíduos selecionados com redução no intervalo entre gerações agregando valor para a conservação da espécie e para o melhoramento animal.

Contudo, ainda existe uma variação na resposta superovulatória em ovelhas doadoras de embriões, onde os fatores intrínsecos possuem um controle mais complexo, sendo necessário uma adequação específica para cada raça nos programas de superovulação, para que o animal possa expressar todo o seu potencial.

A quantificação folicular nas fases de metaestro e no início da SOV não foram capazes de selecionar as doadoras de embriões mais responsivas ao FSH, sendo necessário em estudos futuros utilizar outras metodologias. Além disso, a RPCL se mostrou persistente na maioria das ovelhas, apesar da utilização de estratégias para a sua não ocorrência, ocasionando uma menor taxa de recuperação, porém com embriões viáveis.