



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JULIA TIMPONI DE MOURA LIMA

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

Aluna: Julia Timponi de Moura Lima

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Coorientador: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Aparecida F. Rodrigues

**Niterói
2013**

JULIA TIMPONI DE MOURA LIMA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Coorientador: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Aparecida F. Rodrigues

NITERÓI
2013

JULIA TIMPONI DE MOURA LIMA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 22 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador
Faculdade de Veterinária – UFF

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca - Coorientador
Embrapa Caprinos e Ovinos

Profa. Dra. Carla Aparecida F. Rodrigues - Coorientadora
Faculdade de Veterinária – UFF

Prof. Dr. Alberto Lopes Gusmão
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA

Prof. Dr. Carlos Otávio de Paula Vasconcelos
Faculdade de Veterinária - UFF

NITERÓI
2013

Dedico esse trabalho às queridas ovelhas,
especialmente à Rebeca.

“Aquele que se limita a seguir caminhos que já foram trilhados pode chegar somente onde outros já estiveram.” (Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram e me orientaram durante os trabalhos desenvolvidos.

Agradeço principalmente a Deus, que me deu forças. Aos meus pais Marcos Agilberto e Ana Patrícia e ao meu marido Rodrigo, que nunca deixaram de acreditar em mim, que me apoiaram incondicionalmente e sem os quais eu não teria conseguido vencer. Aos meu sogros Gustavo e Cristina, e cunhados Luiza, Bernardo e Flávia, pelas palavras de conforto e orientação.

À Professora Elyzabeth Cardoso, por me receber no GEPECO. A todo o GEPECO e aos colegas da graduação e da pós-graduação da UFF, agradeço pela companhia, pela disponibilidade, pelo esforço e dedicação durante os experimentos e pelas novas amizades que fiz.

À Monalisa e à Carolina, grandes amigas e companheiras durante esses dois anos, que nunca me deixaram desanimar e com quem sei que poderei contar sempre.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e da Fazenda Escola da UFF, sempre solícitos.

Ao Eduardo Arashiro, à Professora Eunice Oba e ao Professor Rodolpho Torres, pela disponibilidade e presteza.

Ao Professor Felipe Zandonadi Brandão e aos meus coorientadores Jeferson Ferreira da Fonseca e Carla Aparecida Florentino Rodrigues, pela orientação e apoio.

Ao CNPQ, pela concessão da Bolsa de Estudos.

À FAPERJ, pelo apoio financeiro aos trabalhos desenvolvidos:

Estudo sobre métodos de acasalamento em programas de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês visando aumento da produção de embriões (PROTOCOLO DE FINANCIAMENTO E-26/111.613/2009).

Efeito do protocolo de sincronização da onda folicular sobre a resposta ovariana ao tratamento superovulatório e sobre a qualidade das estruturas recuperadas (PROTOCOLO DE FINANCIAMENTO E-26/171.065/2006).

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
RESUMO GERAL	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. CICLO ESTRAL	19
2.2. DINÂMICA FOLICULAR.....	22
2.3. SINCRONIZAÇÃO E SUPEROVULAÇÃO EM OVINOS.....	29
2.4. MONTA NATURAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM PROGRAMAS DE MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	39
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO 1	54
RESUMO.....	55
1. INTRODUÇÃO	57
2 . MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.1. LOCAL, Delineamento e Período Experimental	58
2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	58
2.2.1. Ovelhas	58
2.2.2. Carneiros.....	59
2.2.3. Sincronização do cio base e superovulação.....	59
2.3. OBSERVAÇÃO DO ESTRO E MONTA NATURAL	61
2.4. ULTRASSONOGRRAFIA.....	61
2.5. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA PRÉ-COLHEITA DE EMBRIÕES.....	62
2.6. COLHEITA DE EMBRIÕES	62
2.6.1 Laparoscopia pré-colheita de embriões	62
2.6.2. Colheita de embriões	63
2.6.3. Classificação e congelamento de embriões	64
2.7. PROTOCOLOS ANESTESIOLÓGICOS	65
2.8. CONTROLE DA DOR E MEDICAÇÃO PÓS-CIRÚRGICA	66
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	66

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1.	AVALIAÇÃO DA MANIFESTAÇÃO DO ESTRO E DO MOMENTO DE OVULAÇÃO NO PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO	67
3.2.	DETERMINAÇÃO DE CORPOS LÚTEOS NA ULTRASSONOGRAFIA E NA LAPAROSCOPIA PRÉ-COLHEITA	72
3.3.	RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES..	73
4.	CONCLUSÕES	86
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	CAPÍTULO 2	92
	RESUMO.....	93
1.	INTRODUÇÃO	95
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	96
2.1.	LOCAL, DELINEAMENTO E PERÍODO EXPERIMENTAL	96
2.2.	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	97
2.2.1.	Ovelhas	97
2.2.2.	Carneiros.....	97
2.3.	SINCRONIZAÇÃO DO CIO BASE E SUPEROVULAÇÃO.....	97
2.4.	OBSERVAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTOS	98
2.5.	ULTRASSONOGRAFIA	101
2.6.	AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA E LAPAROSCÓPICA PRÉ-COLHEITA DE EMBRIÕES.....	101
2.7.	COLHEITA E CONGELAMENTO DE EMBRIÕES.....	102
2.8.	PROTOCOLOS ANESTESIOLÓGICOS	102
2.9.	CONTROLE DA DOR E MEDICAÇÃO PÓS-CIRÚRGICA.....	102
2.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	103
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.1.	AVALIAÇÃO DA MANIFESTAÇÃO DO ESTRO E DO MOMENTO DE OVULAÇÃO NO PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO	104
3.2.	DETERMINAÇÃO DE CORPOS LÚTEOS NA ULTRASSONOGRAFIA E NA LAPAROSCOPIA PRÉ-COLHEITA	109
3.3.	RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES	110
4.	CONCLUSÕES	120
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
6.	ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Esquema dos protocolos hormonais para sincronização do estro e superovulação em ovelhas Santa Inês, nos três grupos experimentais.....	60
Figura 2. Histograma da distribuição das ovelhas em relação ao momento de início do estro após a retirada da esponja de progesterona (horas), ao final do protocolo de superovulação.	70
Figura 3. Histograma do número de corpos lúteos visualizados na ultrassonografia (CLUS) realizada no dia anterior ao da colheita de embriões e na laparoscopia (CLLP), logo antes da colheita de embriões, em função dos animais experimentais.	73

CAPÍTULO 2

Figura 1. Esquema dos protocolos hormonais para sincronização do estro e superovulação em ovelhas Santa Inês, nos dois grupos experimentais.	100
Figura 2. Histograma do número de corpos lúteos visualizados na ultrassonografia (CLUS) realizada no dia anterior ao da colheita de embriões e na laparoscopia (CLLP) logo antes da colheita de embriões, em função dos animais experimentais.	110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Grupos experimentais.....	58
Tabela 2. Avaliação dos intervalos (horas) de retirada da esponja ao início do estro (IRE); retirada da esponja à primeira observação da ovulação (IRPO); início do estro à primeira observação da ovulação (IIEPO) e duração do estro (DE), no protocolo de superovulação (média $\pm$ desvio padrão).....	69
Tabela 3. Resposta das ovelhas da raça Santa Inês ao tratamento superovulatório em relação à porcentagem de fêmeas que apresentaram mais de quatro corpos lúteos e ao número de estruturas recuperadas nos três grupos experimentais (média $\pm$ desvio padrão).....	75
Tabela 4. Avaliação ovariana em relação à presença de corpos lúteos, por meio de ultrassonografia transretal e por laparoscopia (média $\pm$ desvio padrão).....	77
Tabela 5. Qualidade das estruturas recuperadas das ovelhas que apresentaram folículos menores ou iguais a 4mm, assim como das ovelhas que apresentaram folículos maiores que 4mm no início da superovulação.....	81

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Grupos experimentais.....	96
Tabela 2. Dados climatológicos durante o período experimental (média $\pm$ desvio padrão).....	97
Tabela 3. Avaliação dos intervalos (horas) de retirada da esponja ao início do estro (IRE); duração do estro (DE); retirada da esponja à primeira observação da ovulação (IRPO); fim da superovulação à primeira observação da ovulação (IFSOVPO) e início do estro à primeira observação da ovulação (IIEPO), no protocolo de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês (média $\pm$ desvio padrão).....	104
Tabela 4. Distribuição das ovelhas em relação ao período (P) da ovulação após a retirada da segunda esponja, ao final do protocolo de superovulação: P1: ovulação antes de 42 horas da retirada da esponja; P2: ovulação entre 42-48 horas após a retirada da esponja e P3: ovulação após 48 horas da retirada da esponja.....	107

Tabela 5. Qualidade das estruturas recuperadas das ovelhas que apresentaram folículos menores ou iguais a 4mm, assim como das ovelhas que apresentaram folículos maiores que 4mm no início da superovulação	113
Tabela 6. Distribuição da resposta à superovulação dos dois grupos por meio da contagem de corpos lúteos na laparoscopia pré-colheita.....	114
Tabela 7. Respostas das ovelhas ao tratamento superovulatório em relação à produção de embriões e qualidade das estruturas recuperadas, após a colheita dos embriões (média $\pm$ desvio padrão).....	115
Tabela 8. Respostas em relação à taxa de recuperação de estruturas, taxa de viabilidade, taxa de não fecundação e taxa de estruturas degeneradas, após a colheita dos embriões (média $\pm$ desvio padrão).....	115
Tabela 9. Estruturas recuperadas nas ovelhas dos dois grupos experimentais (G_{IA} e G_{MN}) que responderam ao protocolo de superovulação (4 ou mais CL) em relação ao número de corpos lúteos visualizados após avaliação laparoscópica.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
CL	Corpo Lúteo
CLLP	Corpos Lúteos visualizados na laparoscopia
CLUS	Corpos Lúteos visualizados na ultrassonografia
DE	Duração do estro
DMPBS	Solução fosfatada tamponada modificada por Dulbecco
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ETCO ₂	CO ₂ Expirado Final
FGA	Acetato de fluorogestona
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FSHo	Hormônio folículo-estimulante de origem ovina
FSHp	Hormônio folículo-estimulante de origem suína
G	Gauge (medida de diâmetro de uma agulha)
GL	Graus Gay Lussac (medida de teor alcoólico)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
g/L	Grama por litro
h	horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IFSOVPO	Intervalo do final da superovulação à primeira observação da ovulação
IIEPO	Intervalo do início do estro à primeira observação da ovulação
I.M.	Intramuscular
IRE	Intervalo da retirada da esponja ao início do estro
IRPO	Intervalo da retirada da esponja à primeira observação da ovulação
I.V.	Intravenoso
kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
LP	Laparoscopia
M	Concentração molar
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
mmHg	Milímetro de mercúrio

mg	Miligramas
mg.kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
MN	Monta natural
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
MOET	Múltipla ovulação e transferência de embriões
ng/mL	Nanogramas por mililitro
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
®	Marca registrada
SOV	Superovulação
SAS	Statistical Analysis System
TE	Transferência de embriões
UI	Unidade internacional
UI/kg	Unidade internacional por quilograma
US	ultrassonografia

RESUMO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tipo de protocolo de sincronização da onda folicular e do método de acasalamento sobre a resposta ovariana ao tratamento superovulatório (SOV) e a qualidade das estruturas recuperadas. No primeiro estudo 15 ovelhas da Raça Santa Inês foram distribuídas em três grupos, sendo que todas as ovelhas passaram por todos os tratamentos ($n=5/\text{grupo/etapa}$). Foram comparados três protocolos de sincronização utilizando um dispositivo intravaginal impregnado com 60mg de acetato de medroxiprogesterona. No G_1 , inseriu-se (D0) a esponja, que foi mantida por quatorze dias e iniciou-se o SOV no dia 12. Nos grupos G_2 e G_3 o dispositivo permaneceu por seis dias (D0-D6) e no D5 aplicou-se 300UI de eCG e 5mg de dinoprost via intramuscular (i.m.). As ovelhas do G_3 receberam 0,025 mg de GnRH i.m. 12h após a retirada do dispositivo. Nos grupos G_2 e G_3 , o SOV iniciou-se 48 h após o fim do protocolo de sincronização. Para todos os grupos, o tratamento consistiu na aplicação de 200mg de FSHp i.m em seis doses decrescentes, a cada 12h. Na primeira dose de FSHp, foi inserida um novo dispositivo nos G_2 e G_3 . Na quinta dose de FSHp, as ovelhas dos G_1 , G_2 e G_3 receberam 5mg de dinoprost i.m. e retirou-se a esponja dos grupos G_2 e G_3 . As coberturas foram iniciadas após a última dose de FSHp e os machos eram colocados com as fêmeas no final da tarde e retirados na manhã seguinte, até o final do estro. Sete dias após as coberturas, realizou-se a colheita de embriões por laparotomia nas ovelhas que apresentaram mais de quatro CLs na avaliação laparoscópica. Nos grupos G_1 , G_2 e G_3 60,00%, 40,00% e 57,14% das fêmeas, respectivamente, responderam ao SOV. O número de CL, de estruturas totais e de embriões viáveis nos grupos G_1 , G_2 e G_3 não diferiu ($P>0,05$). A resposta superovulatória e a qualidade das estruturas recuperadas não foram afetadas pelo tipo de protocolo de sincronização utilizado. No segundo estudo, 15 ovelhas da raça Santa Inês foram submetidas a dois sistemas de acasalamento: Monta Natural (G_{MN}) e Inseminação Artificial (G_{IA}). Todas as fêmeas passaram pelos dois tratamentos ($n=6$ ou $7/\text{grupo/etapa}$). Para a sincronização do cio base e superovulação, utilizou-se o mesmo protocolo aplicado no G_3 do estudo anterior. No G_{MN} as coberturas foram realizadas conforme descrito acima. As fêmeas do G_{IA} foram inseminadas com sêmen congelado, por laparoscopia, 36 e 48h após a retirada da esponja. A avaliação do número de CLs e a colheita de embriões foram realizadas como descrito anteriormente. A porcentagem de ovelhas que responderam ao protocolo de superovulação ($\geq 4\text{CLs}$) foi de 53,30% e 46,70% nos G_{MN} e G_{IA} , respectivamente. O número de estruturas totais recuperadas, a taxa de recuperação, o número de estruturas viáveis e a taxa de viabilidade, não diferiram ($P>0,05$) entre os G_{MN} e G_{IA} . O G_{IA} apresentou um maior ($P<0,05$) número de estruturas não fertilizadas e uma maior taxa de não fertilização em relação ao G_{MN} , respectivamente. O método de acasalamento afetou a qualidade das estruturas recuperadas.

Palavras-chave: Protocolos de sincronização. Superovulação. Monta natural. Inseminação artificial. Produção de embriões. Ovelhas. Santa Inês.

ABSTRACT

The present study was developed to assess the effect of different follicular wave synchronization protocols and two mating methods on the ovarian response and embryo yield in superovulated ewes. In experiment 1 fifteen Santa Ines ewes were allocated in three groups. Each synchronization treatment was repeated for three times ($n=15/\text{group}$) and all females were submitted to all treatments. In G_1 the ewes were synchronized using intravaginal sponges containing 60mg of medroxyprogesterone for 14 days and the superovulatory treatment (SOV) started on day 12. In G_2 and G_3 the ewes were synchronized for 6 days (D0-D6). On D5, ewes of the G_2 and G_3 received 300UI of eCG and 5mg of dinoprost i.m. The ewes of G_3 also received 0,025mg of GnRH i.m. 12 h after the sponge withdrawal (SW). In G_2 and G_3 , the superovulatory treatment started 48 h after the end of synchronization. The SOV in all groups consisted of 200mg of pFSH administered i.m. at 12 h intervals in 6 decreasing doses. At the first dose of pFSH, a new sponge was inserted in the ewes of G_2 and G_3 . At the fifth dose, 5mg of dinoprost was administered i.m. in all groups and the sponge was removed from the ewes of G_2 and G_3 . The mating began after the last dose of pFSH and the ewes were bred at 12 h interval until the end of the estrus. Seven days after the mating, the number of CL was evaluated by laparoscopy and the embryo collection was performed by laparotomy in the females with more than 4 CLs. The percentage of ewes responsive to superovulation ($>4\text{CLs}$) was 60%, 40% and 57,14% in G_1 , G_2 e G_3 , respectively. The number of CL, recovered structures and transferable embryos were not different ($P>0,05$) among G_1 , G_2 and G_3 . The response to the SOV and the quality of the recovered embryos were not affected by the synchronization protocol. In experiment 2 fifteen Santa Ines ewes were assigned into two groups and the synchronization and the SOV protocols were the same used for the G_3 in experiment 1. One group was mated by natural mating (G_{NM}) after the SW and the ewes were bred at 12 hours interval, until the end of the estrus. The other group was artificially inseminated by laparoscopy (G_{AI}) with frozen-thawed semen, 36 and 48 hours after SW. The evaluation of the number of CLs and the embryo recovery were performed as described in experiment 1. The percentage of response to superovulatory treatment ($\geq 4\text{CLs}$) was 53,30% and 46,70% in G_{MN} and G_{AI} , respectively. The number of recovered structures, the recovery rate, the number of transferable embryos and the viability rate did not differ among groups G_{MN} and G_{AI} ($P>0,05$). However, the number of unfertilized oocytes and the unfertilization rate were higher ($P<0,05$) in G_{AI} . The recovered structures quality was affected by the mating method.

Key-words: Synchronization protocols. Superovulation. Natural Mating. Artificial Insemination. Embryo yield. Ewe. Santa Inês breed.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criação de ovinos no Brasil é uma atividade com boas perspectivas em relação ao seu potencial de exploração, o qual, entre outros fatores, está associado à expansão dos mercados interno e externo (GUSMÃO & ANDRADE MOURA, 2005; DIESEL, 2007). Uma das condições que favorecem a criação desta espécie está relacionada com a notável capacidade de adaptação aos diversos ecossistemas existentes (GUSMÃO & ANDRADE MOURA, 2005; GUSMÃO, 2006).

Nos últimos anos as raças deslanadas ganharam mais espaço na ovinocultura nacional. A raça Santa Inês destaca-se por demonstrar boas taxas reprodutivas (SILVA *et al.*, 1987), além de possuir baixa susceptibilidade à endo e ectoparasitas, apresentando boa adaptabilidade em diversos ambientes (BUENO *et al.*, 2000).

Segundo o IBGE (2010), o rebanho brasileiro de ovinos é de aproximadamente 17,3 milhões de animais, sendo que 84,8% do rebanho nacional concentra-se nas regiões Nordeste e Sul. Entretanto, a região Sudeste vem sendo considerada com potencial para a produção de carne ovina, pelo poder de consumo de sua população e pelo crescimento do rebanho ovino nesta região (IBGE, 2006 e 2010). No estado do Rio de Janeiro há um crescente interesse em ampliar os rebanhos e aplicar as técnicas de reprodução assistida, intensificando, assim, a exploração econômica desta espécie.

O desempenho reprodutivo de um rebanho é um ponto importante para o ganho de produtividade e está associado a um bom manejo sanitário e nutricional. Além disso, o principal fator para a evolução e o incremento da produção e produtividade nas culturas, seja de origem vegetal ou animal, é o aprimoramento genético, aliado à implantação de programas de reprodução assistida utilizando biotecnologias reprodutivas (BICUDO, SOUSA, & TAKADA, 2003; GRANADOS, DIAS & SALES, 2006).

Dentre as biotecnologias de reprodução disponíveis, a inseminação artificial é a técnica que apresenta maior aplicabilidade e praticidade e permite a difusão mais acelerada, nos rebanhos, das características desejáveis dos reprodutores superiores (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Há também a criopreservação de sêmen, a sincronização da indução do estro e da ovulação, a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) (AISEN, 2008).

A transferência de embriões, considerada a segunda geração de biotecnologias da reprodução (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008), tem como principal objetivo otimizar a atividade reprodutiva das fêmeas por meio da disseminação de animais geneticamente superiores e da redução do intervalo entre gerações e, entre as diversas vantagens, contribui para o controle de transmissão de doenças e reduz os custos de importação e exportação de material genético superior (SHISONG & WRATHALL, 1989; GUSMÃO & ANDRADE MOURA, 2005; BALDASSARE, 2008)

Atualmente, em função da expansão desta técnica, há maior necessidade de estudo e compreensão de seus fenômenos para a incrementação de seus índices. Neste contexto, estudos envolvendo a transferência de embriões na espécie ovina ocupam papel de destaque (FONSECA, SOUZA & BRUSCHI, 2007; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008).

Assim, a superovulação, bem como os métodos de acasalamento de doadoras na espécie ovina, são áreas que demandam estudos mais aprofundados para determinação de protocolos de superovulação e inseminação mais simples, eficientes, menos estressantes e menos onerosos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CICLO ESTRAL

O ciclo estral é um conjunto de eventos reprodutivos que se repetem em intervalos regulares, inicia-se no estro e termina no estro seguinte e é regulado por diversas modificações neuroendócrinas, resultantes da interação entre o sistema nervoso central (hipotálamo, hipófise) e o sistema reprodutor (ovários e útero) (MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

Vários estudos sobre a influência do fotoperíodo no ciclo reprodutivo evidenciaram que a origem geográfica dos animais e a latitude na qual se encontram são fatores determinantes no efeito da luz sobre a atividade reprodutiva dos ovinos (PIRES *et al.*, 2011). Quanto maior a latitude maior é a influência do fotoperíodo sobre o ciclo reprodutivo desta espécie (DA COSTA, 2007).

As fêmeas ovinas das raças originárias de latitudes médias (entre 20° e 40° de latitude) e elevadas (acima de 40°) comportam-se como poliéstricas estacionais. A atividade sexual é regulada pelo fotoperíodo, ou seja, a atividade sexual e as ovulações se iniciam quando as horas de luz diminuem (outono-inverno). Nos períodos de maior duração da luz, as fêmeas entram em inatividade sexual e este anestro sazonal, provavelmente, é uma adaptação das fêmeas para evitar que os partos ocorram em períodos do ano nos quais as condições de clima e a disponibilidade de alimentos sejam desfavoráveis para a sobrevivência dos neonatos (SENGER, 1999).

Nas raças que se originaram ou estão em regiões mais próximas da linha do equador, a influência do período de luz sobre a estacionalidade reprodutiva não é evidente, pois a diferença de horas de luz e escuridão, por dia, é menor. Portanto, a atividade reprodutiva sofre mais influência das condições ambientais, como a disponibilidade e qualidade de alimento (DA COSTA, 2007; MORELLO & CHEMINEAU, 2008), sendo que os efeitos do fotoperíodo diminuem e podem chegar a ser ausentes (HAFEZ, 1952). Raças de ovelhas deslanadas criadas no nordeste do Brasil ou em regiões de clima tropical úmido, como as ovelhas da raça Santa Inês, são consideradas poliéstricas contínuas ou anuais, por apresentarem atividade

reprodutiva durante todo o ano (CUNHA, *et al.*, 2001; FONSECA, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

O ciclo estral das ovelhas dura 16-17 dias, podendo haver uma variação de 14-18 dias e compreende duas fases: a fase luteal, de 13 a 17 dias, e a fase folicular, de 3 a 4 dias (EVANS, 1952; FONSECA, 2005). A fase luteal inicia-se após a ovulação e caracteriza-se pela ocorrência de luteinização do folículo ovulado. Por ação do pico de LH, responsável pela indução da ovulação, as células da granulosa, na parede do folículo rompido, se transformam em células luteínicas, que preenchem todo o folículo, levando à formação do corpo lúteo 4-5 dias após a ovulação (EVANS, 1952).

O corpo lúteo atinge o pico de produção de progesterona (3-4ng/mL de plasma) entre o sexto e o oitavo dias do ciclo estral e mantém um nível constante de secreção até a luteólise, no 15^o dia do ciclo. Nesta fase, a concentração de progesterona exerce uma forte inibição sobre a secreção de LH hipofisário. A fase luteal pode estender-se, caso a fêmea fique gestante, por toda a gestação, com o corpo lúteo permanecendo funcional e produzindo progesterona em níveis constantes (EVANS, 1952; GORDON, 1997; MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

No 15^o dia do ciclo, em fêmeas não gestantes, ocorre aumento da secreção de PGF_{2α}, que induz ao processo de regressão luteal. Com isso, há a redução da secreção de progesterona pelo corpo lúteo em regressão, o que levará à perda da sua capacidade esteroidogênica (luteólise funcional), à morte celular, involução e reabsorção tecidual (luteólise estrutural) em cerca de 2-3 dias (BERISHA & SCHAMS, 2005; MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

Após a luteólise, induzida pela ação da PGF_{2α} secretada pelo útero, interrompe-se a inibição das altas concentrações de progesterona sobre a secreção de gonadotrofinas (FSH e LH) pela hipófise (BARTLEWSKI, BABY, & GIFFIN, 2011). Assim, a redução dos valores plasmáticos de P₄ para níveis basais (<1ng/mL de plasma), devido à luteólise, reduz a retroalimentação negativa sobre o hipotálamo e a hipófise, promovendo a elevação na concentração de FSH e o aumento da pulsatilidade de LH, dando início ao desenvolvimento da primeira onda de crescimento folicular.

Sob estímulo do FSH, ocorre o crescimento inicial de alguns folículos e na fase final do desenvolvimento folicular, após estabelecida a dominância na onda folicular pré-ovulatória, é observada a expressão de receptores de LH na camada de

células da granulosa do ovário (DA COSTA, 2007). Portanto, o aumento da frequência dos pulsos de LH estimula o crescimento folicular na sua fase final de desenvolvimento e a ovulação dos folículos pré-ovulatórios (EVANS, 1952; GORDON, 1997; MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

Estudiosos observaram a relação entre a variação da concentração de FSH e o padrão de crescimento folicular ao longo do ciclo estral e constataram que o aumento transitório de FSH seria um dos fatores desencadeantes da emergência de uma onda folicular (EVANS, 2003), fato primeiramente observado em bovinos e, posteriormente, em ovinos e caprinos.

Os folículos em crescimento produzem estrógeno e a produção deste hormônio aumenta à medida que eles se desenvolvem e atingem o tamanho pré-ovulatório. Este aumento nas concentrações de estradiol, na fase folicular final, estimula o hipotálamo a liberar uma grande quantidade de GnRH, induzindo o pico pré-ovulatório de LH, o qual desencadeia a ovulação 18-24 horas após, além disso, a alta concentração de estradiol circulante, nesta fase, também é responsável por induzir o início do estro e as alterações anatômicas associadas (EVANS, 1952; GORDON, 1997; PACHECO & QUIRINO, 2010).

O estro é o período no qual a fêmea fica receptiva ao macho (aceita a monta), demonstrando comportamentos diferenciados, tais como: movimentação da cauda, aumento da frequência de micção, interesse pelo macho e imobilidade quando é montada por este. Além disso, há sinais como hiperemia de vulva e secreção de muco vaginal (EVANS, 1952; GORDON, 1997; MORELLO & CHEMINEAU, 2008; PACHECO & QUIRINO, 2010). Os sinais de estro nas ovelhas são um pouco menos evidentes do que em outros ruminantes (LINDSAY & FLETCHER, 1972; GORDON, 1997). O comportamento de estro mais evidente na ovelha é a imobilidade quando montada pelo macho. O início do estro é determinado pelo momento em que a fêmea aceita a monta pela primeira vez (PACHECO & QUIRINO, 2010).

A primeira ovulação, na puberdade ou no início da estação de acasalamento, é seguida pelo aumento da secreção transitória de progesterona, produzida pelo corpo lúteo formado, sensibilizando o sistema nervoso central ao estrógeno (RAVINDRA & RAWLINGS, 1997; DA COSTA, 2007; MORELLO & CHEMINEAU, 2008). Somente após a ocorrência da fase luteal completa do primeiro ciclo ovulatório, na qual há o aumento transitório da concentração da progesterona (impregnação pela progesterona), é que a exposição a maiores concentrações de

estrógeno, por 1 ou 2 dias, produzido pelo grupo de folículos que se desenvolvem no segundo ciclo ovulatório, será capaz de induzir o estro nas fêmeas (RAVINDRA & RAWLINGS, 1997, SENGHER, 1999; MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

A duração aproximada do estro das ovelhas é de 30 horas (BICUDO *et al.*, 2005; MORELLO & CHEMINEAU, 2008). Segundo Gonzalez (2002), o estro pode ter duração de 24 a 48 horas, sendo que esta variação está associada às diferenças entre raças e taxas de ovulação. A idade, a estação do ano e a presença do macho também são fatores que influenciam na duração do estro. Diversos estudos evidenciaram que a presença contínua do macho pode reduzir a duração do estro e adiantar o momento da ovulação em relação ao início do estro (GORDON, 1997).

A ovulação nas ovelhas é espontânea e ocorre no final do estro (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Em geral, as ovelhas ovulam cerca de 30 horas (MORELLO & CHEMINEAU, 2008) ou entre 25-30 horas após o início do estro. Em fêmeas com estro curto, a ovulação tende a ocorrer após o fim do estro (EVANS, 1952). A taxa de ovulação das fêmeas também sofre influência da raça, da idade, do estado reprodutivo da ovelha, da condição corporal e estado nutricional, assim como da estação do ano (NOGUEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2011).

2.2. DINÂMICA FOLICULAR

O controle do estro e da ovulação é fundamental em um programa reprodutivo ovino que aplica biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões (FREITAS & RUBIANES, 2008). Com a difusão do uso da inseminação artificial nos programas reprodutivos de rebanhos ovinos e caprinos e o interesse do produtor em concentrar a época de parição, visando facilitar o manejo das fêmeas e dos cordeiros, e acelerar o melhoramento genético dos rebanhos, impôs-se a necessidade de controle do ciclo estral (MOBINI, HEATH & PUGH, 2005). Dessa forma, o melhor conhecimento da dinâmica folicular é importante para desenvolver métodos mais eficientes para a manipulação da reprodução tanto na espécie ovina, quanto em outras espécies domésticas.

Até meados da década de 80, estudos baseados em avaliações dos ovários em peças de matadouros, por laparotomia e histologia foram utilizados para descrever o crescimento folicular, sendo proposta a hipótese do desenvolvimento

folicular em ondas (RAJAKOSK, 1960; EVANS, 2003). A partir do advento da ultrassonografia e sua utilização, inicialmente, para estudos da reprodução em fêmeas bovinas, foi possível entender com maior acurácia a dinâmica do desenvolvimento folicular (PIERSON & GINTHER, 1984).

Durante as últimas três décadas, houve um avanço significativo em relação aos 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 (RAVINDRA & RAWLINGS, 1997; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011).

O ciclo ovariano é o fenômeno central da função reprodutiva e caracteriza-se pela atividade sincrônica e cíclica de proliferação, diferenciação e transformação celular, que resultam no desenvolvimento folicular e na ovulação, assim como na formação, ativação e regressão do corpo lúteo (BERISHA & SCHAMS, 2005).

Ao nascimento, os ovários das fêmeas já possuem um *pool* de folículos primordiais (40.000-300.000) que se desenvolverão ao longo da vida reprodutiva da fêmea. Apesar de, inicialmente, o ovário possuir um grande número de folículos, muitos deles degeneram ao longo da fase de vida pré-natal do animal e apenas poucos irão crescer e amadurecer, transformando-se em folículos ovulatórios ao longo dos ciclos estrais a partir da puberdade (EVANS, 2003).

No decorrer da vida reprodutiva da fêmea, os folículos primordiais inativos tornam-se ativos em intervalos regulares e desenvolvem-se em folículos primários (GORDON, 1997). Por meio da ativação de fatores parácrinos que levam ao desenvolvimento das células da granulosa e da teca, esses folículos primários formam os folículos secundários que por sua vez se diferenciam em folículos terciários (ou antrais) (EVANS, 1952; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011). Estudos evidenciam que em qualquer momento existem, aproximadamente, 50 folículos antrais nos ovários de ovelhas adultas (EVANS, 2003).

Este processo ocorre em todas as fases do ciclo reprodutivo das fêmeas. Com o início da puberdade, os folículos antrais tornam-se responsivos aos hormônios gonadotróficos, finalizando, assim, o seu crescimento e maturação até alcançarem o estágio de folículos pré-ovulatórios (GRANADOS, DIAS, & SALES, 2006).

Os folículos pré-ovulatórios atingem um tamanho mínimo de 4 mm de diâmetro (MORAES & SOUZA, 2002; EVANS, 2003; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011). Estima-se que o período de crescimento do folículo primordial até o estágio pré-ovulatório exceda seis meses (BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011).

Em um mesmo ciclo estral, grupos de folículos emergem em momentos intercalados, caracterizando as ondas foliculares (GORDON, 1997; EVANS, 2003). A partir da observação de que há flutuações no número de folículos de diferentes tamanhos 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).

Uma onda de crescimento folicular é definida como a emergência sincronizada, a partir de um *pool* de folículos, de um grupo de 1-4 folículos antrais (2-3 mm) gonadotrofino-dependentes, dos quais, normalmente, um ou dois folículos atingem um diâmetro de 4 mm ou mais, enquanto os outros entram em atresia e regredem (EVANS *et al.*, 2000).

Em estudos nos quais se avaliou a dinâmica folicular em ovelhas, confirmou-se que o desenvolvimento folicular ocorre em padrão de ondas tanto na estação de acasalamento quanto na fase de anestro e no período de transição entre estas duas estações (DRIANCOURT *et al.*, 1990; GINTHER, KOT, & WILTBANK, 1995; SOUZA, CAMPBELL & BAIRD, 1996; RAVINDRA & RAWLINGS, 1997; DUGGAVATHI *et al.*, 2003; EVANS, 2003). O crescimento folicular em ondas também foi descrito na fase de gestação, no pós-parto e na lactação (EVANS, 2003).

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 (NOEL, BISTER, & PAQUAY, 1993; VIÑOLES, FORSBERG, BANCHERO, 2000). Observou-se que durante a estação de acasalamento ocorrem entre 3-4 ondas de emergência folicular, entre cada intervalo interovulatório (BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011), concordando com os resultados obtidos por Noel, Bister, & Paquay (1993) que, ao estudarem a dinâmica folicular ovariana por laparoscopia em ovelhas Suffolk, verificaram a ocorrência de três ondas de crescimento e atresia folicular durante o ciclo estral, sendo duas durante a fase luteal e uma durante a fase folicular.

Leyva *et al.* (1995) realizaram monitoramento da atividade folicular ovariana por meio de ultrassonografia transretal e observaram que, na maioria das ovelhas (80%), ocorreram três ondas de desenvolvimento folicular num ciclo normal de 17

dias e que a ovulação ocorreu na última onda. Evans *et al.* (2000), ao estudarem o padrão de desenvolvimento folicular em cordeiras, descreveram que ocorrem, predominantemente, de 2 a 3 ondas de crescimento folicular durante um mesmo ciclo estral e, neste mesmo estudo, as fêmeas que tiveram maior número de ondas foliculares por ciclo apresentaram um ciclo estral de maior duração.

Predominantemente, os folículos ovulatórios se desenvolvem a partir do grupo de folículos da última onda folicular (EVANS, *et al.*, 2000; EVANS, 2003). Sabe-se que este padrão de desenvolvimento do folículo antral está associado à ocorrência dos picos transitórios das concentrações diárias de FSH no início da emergência da onda folicular. Esses aumentos transitórios de FSH só ocorrem logo antes da emergência da onda, sendo que as fases seguintes de desenvolvimento e atresia folicular são independentes das flutuações de FSH. Os picos de FSH coincidem com aumentos transitórios nas concentrações séricas de estradiol, e o final da fase de crescimento do maior folículo de sucessivas ondas, coincide com a ocorrência do pico de estradiol (BARTLEWSKI *et al.*, 1999; BARTLEWSKI, BEARD & RAWLINGS, 2000; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011; DUGGAVATHI *et al.*, 2003).

De acordo com estudos para caracterizar a dinâmica da onda folicular, observou-se que, em cada onda, ocorrem os seguintes eventos: emergência, seleção, desvio e dominância (EVANS, 2003)

Na emergência folicular, um grupo de folículos dependentes de hormônios gonadotróficos começa a crescer, caracterizando o primeiro dia da onda folicular, na qual é possível detectar os folículos em crescimento por meio da ultrassonografia (GINTHER, KOT & WILTBANK, 1995; EVANS, 2003). Nesta fase da onda folicular, os folículos atingem entre 2-4 mm na espécie ovina (EVANS *et al.*, 2000).

Como descrito em bovinos e ovinos, a partir deste momento inicia-se a seleção folicular, que resulta na redução do número de folículos em crescimento, continuando a crescer somente aqueles que irão ovular. O fim da seleção folicular ocorre quando somente o maior folículo (folículo dominante) continua a crescer, o crescimento dos outros folículos (subordinados) é inibido e eles regridem. Observa-se, então, uma divergência na curva de crescimento do folículo dominante em relação aos subordinados, ou seja, ocorre o desvio (GINTHER *et al.*, 1996; EVANS, 2003).

Os folículos dominantes atingem diâmetro máximo entre 5-7 mm (GINTHER, KOT & WILTBANK, 1995; BARTLEWSKI *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2000). Já o

maior folículo subordinado, atinge o tamanho máximo de 3-5 mm. O folículo é considerado dominante quando ele continua crescendo, enquanto o desenvolvimento dos folículos subordinados é inibido, determinando a dominância folicular (EVANS, 2003).

Rubianes & Menchaca (2003) destacaram as oito características mais frequentes das ondas de crescimento folicular na espécie ovina e caprina: 1. pelo menos um folículo atinge o diâmetro ≥ 5 mm por onda; 2. o maior folículo de cada onda cresce de 5-7 dias, com uma taxa de crescimento de 1 mm/dia; 3. o diâmetro máximo do maior folículo difere entre ondas; 4. à medida que a fase luteal avança, a concentração plasmática de progesterona eleva-se, a renovação folicular é facilitada e os intervalos entre as ondas tornam-se menores do que durante a fase luteal inicial; 5. durante as fases luteais intermediária e final, os folículos que não crescem acima de 4 mm não fazem parte do fenômeno da onda. Sugere-se que estes representem um *pool* de folículos de dinâmica subjacente; 6. os maiores folículos, presentes nos ovários no dia da luteólise, são aqueles que irão ovular; 7. na maioria dos ciclos com duas ovulações, os folículos ovulatórios emergem da mesma onda folicular, mas em alguns casos eles podem ter emergido em ondas foliculares diferentes; 8. duplas ovulações ocorrem com intervalo de 24 horas entre as mesmas.

Há evidências de que o maior folículo da onda inibe o desenvolvimento dos outros folículos em algumas espécies domésticas (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a). Em bovinos, a dominância folicular parece ser controlada por inúmeros mecanismos que atuam conjuntamente, os quais incluem as alterações na concentração endógena de FSH, induzidas pelo estradiol e pela inibina secretados durante a fase de crescimento do folículo dominante. Os folículos subordinados não podem sobreviver em um meio com reduzidas concentrações de FSH, sendo destinados à atresia (GINTHER *et al.*, 2001). Por outro lado, o folículo dominante desenvolve mecanismos intrafoliculares que ampliam o suporte desta gonadotrofina, podendo sobreviver neste meio (FORTUNE *et al.*, 2001).

Atualmente, vários estudos são feitos no sentido de esclarecer a possibilidade de ocorrência de difusão de fatores de inibição entre o folículo dominante e o subordinado. Dessa forma, surge a hipótese de que, associado à regulação intraovariana pela secreção de fatores inibitórios, há uma interação direta folículo-folículo, que permitiria que o folículo dominante determinasse o destino dos folículos

adjacentes por meio de alterações funcionais, as quais contribuiriam para aumentar os efeitos endócrinos da dominância folicular (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004b).

Para obter um contínuo crescimento e sobrevivência de um *pool* de pequenos e médios folículos é necessário manter a concentração sanguínea de FSH alta. Portanto, segundo estudos prévios, a presença de um folículo dominante no início da superovulação poderá afetar a resposta ovariana (FORTUNE *et al.*, 2001; GINTHER *et al.*, 2001).

Descobertas semelhantes foram observadas em ovelhas (RUBIANES *et al.*, 1997) submetidas a um tratamento superovulatório com FSH, dividido em seis aplicações iguais a cada 12 horas, tendo seu início no momento da emergência da primeira onda de crescimento folicular (imediatamente após a ovulação) ou três dias mais tarde (na ausência ou presença de um folículo de maior diâmetro). Todos os animais foram avaliados por meio de ultrassonografia transretal, duas vezes ao dia, quanto ao número total de folículos iguais ou maiores do que 3 mm.

Neste estudo, o recrutamento folicular promovido pelo FSH foi afetado pela presença do maior folículo em fase de crescimento no momento em que se iniciou o tratamento (ovelhas tratadas no dia 3). Nas ovelhas tratadas no dia zero, o FSH promoveu um aumento da população de grandes folículos nas 48, 72 e 96 horas posteriores ao início do tratamento. Por outro lado, a presença de um folículo grande no início do tratamento (ovelhas tratadas no dia 3) reduziu o número de folículos recrutados, sendo este fato atribuído ao efeito inibitório da presença de um folículo dominante.

Rubianes, *et al.* (1995) também observaram que a resposta ao tratamento superovulatório com eCG foi melhor em ovelhas que não apresentavam folículos grandes no início do tratamento com essa gonadotrofina. Estas ovelhas apresentaram maior porcentagem de corpos lúteos normais, observados cinco dias após os acasalamentos.

No crescimento folicular ao longo do ciclo estral, avaliado por Evans *et al.* (2000), em cada onda, somente um folículo atingiu um tamanho significativamente maior em relação ao segundo maior folículo e as fêmeas foram, predominantemente, monovulares, evidenciando a ocorrência da dominância folicular em ovelhas.

Porém, em estudos posteriores realizados por Bartlewski *et al.* (1999) e Gibbons *et al.* (1999) observou-se que folículos antrais da última e da penúltima ondas podem ovular simultaneamente, ou seja, pode ocorrer codominância folicular

em ovinos. De acordo com estudos mais recentes, ainda existem algumas controvérsias em relação à ocorrência da dominância folicular e ao efeito da mesma sobre a resposta folicular em ovinos submetidos à programas de superovulação (EVANS *et al.*, 2000; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011).

Em estudo anterior realizado por Driancourt, Webb, & Fry (1991) observou-se que, possivelmente, não ocorre a dominância folicular em ovelhas. Estes autores avaliaram o uso de 1250 UI de eCG para superovulação, que foi aplicado, em dose única, 0, 6, 12, 24 ou 36 horas após a remoção do implante de progesterona utilizado para sincronização das fêmeas. Foi observado a presença de folículo pré-ovulatório (> 6 mm) em ovelhas dos cinco grupos e em todas as ovelhas havia folículos maiores que 3 mm no início do tratamento com eCG. No entanto, a taxa de ovulação das ovelhas não foi afetada pela presença do folículo dominante no início do tratamento de superovulação.

Os mesmos autores realizaram um tratamento superovulatório com hormônio gonadotrófico no dia 6 ou 9 do ciclo estral em ovelhas que tiveram os folículos grandes cauterizados, bem como em ovelhas não cauterizadas. Neste estudo também observou-se que a presença de um folículo pré-ovulatório, no início da superovulação, não influenciou na taxa de ovulação.

Portanto, os folículos dominantes não impediram o crescimento de outros folículos, evidenciando que, possivelmente, a situação de codominância ocorre em ovelhas com múltiplas ovulações. Nesta circunstância, o padrão de crescimento dos folículos ovulatórios passa a ser como o de um folículo dominante e os folículos subordinados regridem (EVANS *et al.*, 2000).

Assim, verifica-se que o mecanismo de seleção folicular em ovinos diferencia-se dos bovinos e dos humanos, nos quais há influência de compostos secretados pelo folículo dominante e do estímulo das gonadotrofinas liberadas sobre a seleção folicular.

Observações semelhantes foram descritas em estudo recente realizado por Bartlewski, Baby & Giffin (2011), que descreveram que o maior folículo ovariano de uma onda folicular não exerce efeito inibitório sobre a emergência de uma nova onda folicular e o desenvolvimento de pequenos folículos antrais, como ocorre nos bovinos e outros ruminantes. Com isso, sabe-se que mais de um folículo pode atingir o tamanho pré-ovulatório numa mesma onda e que folículos de duas ondas consecutivas podem ovular no mesmo momento, o que evidencia que o surgimento

de novos folículos na presença de um dominante pode ser diminuído, mas não inibido.

Dessa forma, com base em estudos mais recentes, sugere-se que a dominância folicular seja fraca ou ausente nas ovelhas (EVANS, 2003; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011).

2.3. SINCRONIZAÇÃO E SUPEROVULAÇÃO EM OVINOS

Os programas de Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE) possuem o potencial de promover um melhoramento genético acelerado nos rebanhos ovinos (GORDON, 1997; BARI *et al.*, 2000), visto que múltiplos embriões podem ser obtidos de cada fêmea geneticamente superior (HARESIGN, 1992), aumentando a pressão de seleção genética e reduzindo o intervalo entre gerações pela obtenção de embriões de fêmeas jovens (COGNIÉ, *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2011). Porém, para que o potencial dessa técnica seja explorado na sua máxima capacidade é necessário que seja produzida uma grande quantidade de embriões transferíveis.

A transferência de embriões envolve as etapas de sincronização e superovulação das doadoras, seguidas da fertilização das mesmas (monta natural ou inseminação artificial), colheita de embriões entre o sexto e sétimo dia após o início do ciclo estral e posterior transferência dos embriões em fêmeas receptoras para completarem a gestação (VARAGO *et al.*, 2009). O sucesso de um programa de MOTE depende de um adequado manejo sanitário, nutricional e reprodutivo das fêmeas. A associação destes aspectos permite que o animal expresse seu potencial genético por meio da sua produtividade (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008)

A aceitação desta biotecnologia por parte dos criadores de ovinos e caprinos tem ocorrido de maneira lenta, principalmente devido à variabilidade das respostas ovarianas aos tratamentos superovulatórios (COGNIÉ, 1999; COGNIÉ *et al.*, 2003). Os resultados da transferência de embriões podem ser afetados pelo sincronismo entre doadoras e receptoras, pelos protocolos hormonais utilizados, pelo tipo de acasalamento, pela resposta superovulatória, taxa de fertilização e qualidade dos embriões das doadoras (BARI *et al.*, 2000). Em estudos utilizando tratamentos superovulatórios, observa-se uma grande variação nas taxas de ovulação

(RUBIANES *et al.*, 1995), as quais podem ser afetadas por diversos fatores intrínsecos ou extrínsecos ao animal (OLIVEIRA, 2011).

Sabe-se que a variabilidade da resposta de cada fêmea ao tratamento gonadotrófico deve-se, principalmente, à variação na resposta folicular (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A eficiência do protocolo de sincronização (ARASHIRO *et al.*, 2009), o perfil de progesterona induzido pelo dispositivo utilizado no tratamento, o protocolo de superovulação utilizado (ARMSTRONG & EVANS, 1983), a dose de gonadotrofina utilizada e a condição folicular no início do tratamento superovulatório (RUBIANES *et al.*, 1995; RUBIANES *et al.*, 1997; VARAGO *et al.*, 2009) são fatores que interferem na resposta superovulatória dos ovinos.

A assincronia ovariana em relação à fase na qual se encontra a onda folicular no início do tratamento com gonadotrofinas, marcada pela presença de folículos maiores que 5-6 mm de diâmetro no início da superovulação (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002c; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002d; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008), é um dos principais fatores que contribuem para essa variabilidade

Os folículos ovulatórios, em ovelhas e cabras superovuladas, são derivados dos pequenos folículos antrais presentes no início do tratamento superovulatório com FSH (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002a; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2003). Com isso, os mesmos autores sugerem que a grande variação na população de folículos antrais, entre animais, poderia explicar a ocorrência da variação individual da resposta à superovulação, em relação à taxa de ovulação e à produção de embriões.

Tratamentos superovulatórios iniciados na ausência de um folículo dominante garantem uma boa resposta ovulatória, de acordo com os padrões de ovulação da espécie (ARMSTRONG, 1993; DRIANCOURT, 2001), resultando em melhores taxas de recrutamento folicular, de ovulação e de produção de embriões (RUBIANES *et al.*, 1995; RUBIANES *et al.*, 1997).

Dessa forma, a resposta ao tratamento superovulatório é aumentada, significativamente, quando o mesmo é aplicado no momento da emergência da onda folicular. Por outro lado, quando este se inicia um dia após a emergência da onda, há redução da resposta ao FSH (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002c).

O uso da sincronização e da indução do estro tem como objetivo a concentração de animais em estro num intervalo de 24 a 72 horas, durante a estação reprodutiva ou nas estações de transição e de anestro (URIBE-VELÁSQUEZ,

CADAVID, & OSORIO, 2009). Dessa forma, a sincronização do estro facilita e otimiza os processos envolvidos nos programas de superovulação e transferência de embriões (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008). Diversas técnicas podem ser utilizadas para a sincronização e indução do estro em pequenos ruminantes: efeito macho (LUCIDI, BARBONI, & MATTIOLI, 2001), sincronização e indução do estro por meio de pessários vaginais de progestágenos (URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID, & OSORIO, 2009) associados à administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou GnRH (GORDON, 1997; CAVALCANTI *et al.*, 2006; CAVALCANTI *et al.*, 2012), indução hormonal através de implante de melatonina (TRALDI, 2007), uso de prostaglandinas (RUBIANES & MENCHACA, 2003) e utilização do fotoperíodo artificial (TRALDI, 2007).

Dentre os métodos para sincronizar a emergência da onda folicular, o estro e induzir a ovulação, a aplicação de esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos tem sido amplamente utilizada em ovelhas e cabras, antes do início da superovulação, demonstrando bons resultados em relação ao percentual de animais em estro, à sincronia e à fertilidade (SIMPLÍCIO, FREITAS, & FONSECA, 2007; URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID, OSORIO, 2009). O uso destes implantes para sincronização da onda folicular, antes do início do tratamento superovulatório, aumentou a indução do estro e proporcionou uma melhor resposta superovulatória (RUBIANES *et al.*, 1995).

Nos protocolos de sincronização longos (tradicionais), a esponja permanece por 12 dias (AZAWI & AL-MOLA, 2011) ou 14 (CORDEIRO *et al.*, 2003; ARASHIRO *et al.*, 2009). Apesar dos benefícios da sincronização em programas de reprodução assistida, foi observado que a sincronização do estro desencadeia diversas mudanças na dinâmica folicular em ruminantes (URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID, OSORIO, 2009). O uso desses protocolos longos tem sido associado à redução do número de ovulações e embriões transferíveis (OLIVEIRA, 2011).

Foi verificado em diversos estudos que os tratamentos de sincronização tradicionais, sem a troca do dispositivo e com a permanência do mesmo por mais de 10 dias, predispõem à baixa concentração de progesterona ao final do tratamento, a qual pode atingir níveis abaixo do fisiológico, afetando os padrões de liberação de LH. Este fenômeno tem sido responsável por afetar a fertilidade das doadoras nos programas de MOTE, visto que provoca alterações no padrão de crescimento folicular, na qualidade dos oócitos ovulados, no processo de fecundação, no

transporte e na sobrevivência dos espermatozoides e no desenvolvimento embrionário (WHERMAN *et al.*, 1993; LEVYA, BUCKRELL, & WALTON, 1998; BARI *et al.*, 2000; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2005; URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID, & OSORIO, 2009; OLIVEIRA, 2011).

Atualmente, uma das estratégias utilizadas no sentido de obter melhores respostas superovulatórias e de produção de embriões é a diminuição deste período de exposição à progesterona para 6 dias (protocolo curto) (ARASHIRO *et al.*, 2009; CAVALCANTI, *et al.*, 2012). Isto reduz o tempo necessário entre a sincronização e o início da superovulação e otimiza todo o programa de MOTE (FONSECA, 2005). Além disso, verificou-se que os protocolos de curta duração são mais eficientes que os de longa duração, pois evitam a ovulação de folículos envelhecidos, produzindo melhores taxas de fertilização (FONSECA, 2005).

A prostaglandina (PGF2 α) tem sido associada aos protocolos de sincronização devido à sua ação de induzir a lise do corpo lúteo e, assim, reduzir a duração dos tratamentos com progestágenos, garantindo que um elevado número de fêmeas entre em estro precocemente após a retirada da esponja (SOUZA *et al.*, 2007; FREITAS & RUBIANES, 2008). No caso da aplicação de protocolos curtos seguidos de tratamentos superovulatórios, também associa-se a administração de prostaglandina ou do seu análogo sintético ao final do protocolo superovulatório com gonadotrofinas (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008)

Outro hormônio que tem sido associado à terapia de progestágenos é a eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina). A sua aplicação tem como objetivo aumentar a produção de estrogênio pelo folículo, induzindo à melhora na taxa de resposta ovulatória das fêmeas ovinas e na sincronização do estro, além de reduzir o intervalo entre a retirada do implante e a ovulação (CARDWELL, FITCH, GEISERT, 1998; URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID & OSORIO, 2009). No estudo de Cardwell, Fitch, Geisert. (1998), observou-se que o início do estro e a ovulação ocorreram mais precocemente e de forma mais uniforme nas ovelhas sincronizadas com progestágeno associado ao uso de eCG. Langford (1982) também observou que o uso de eCG, em ovelhas sincronizadas com progestágeno, promoveu uma melhora na fertilidade, provavelmente pelo fato da eCG induzir ao crescimento de um maior número de folículos, resultando em um maior número de ovulações e melhor sincronização das ovulações.

O uso de GnRH ao final dos protocolos de sincronização, previamente ao tratamento superovulatório com FSH, foi associado ao aumento da taxa de ovulação e à concentração do momento das ovulações (COGNIÉ, 1999). Este hormônio pode ser aplicado 24 horas (CAVALCANTI *et al.*, 2012) ou entre 30-36 horas após a retirada da esponja (WALKER *et al.*, 1989; COGNIÉ *et al.*, 2003).

Quando se utiliza sêmen congelado para as inseminações, o GnRH é aplicado visando sincronizar o momento das ovulações (COGNIÉ *et al.*, 2003). Além disso, sua associação aos protocolos de sincronização com progestágeno previne ou reduz a ocorrência de regressão luteal precoce (OLIVEIRA, 2011). Assim, o seu uso promove uma redução na variabilidade das respostas superovulatórias por meio da inibição de folículos grandes no início do tratamento superestimulatório (COGNIÉ, 1999).

Programas de superovulação e transferência de embriões em ovinos, assim como em outras espécies domésticas, consistem na administração de altas doses de gonadotrofinas, visando induzir ovulações múltiplas e obter o maior número possível de embriões viáveis por ciclo, os quais poderão produzir gestações (VEIGA-LOPEZ, *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2011). Considera-se que um protocolo de superovulação foi bem sucedido quando ocorrem mais ovulações do que o normal, para uma determinada raça, em relação ao número de ovulações em condições de ciclo estral natural (SIMONETTI *et al.*, 2008).

Os resultados dos tratamentos superovulatórios em ovinos e caprinos ainda apresentam alto grau de variabilidade em relação à taxa de ovulação e de recuperação de embriões (COGNIÉ, 1999; FONSECA, 2005), sendo considerado como a maior limitação dos programas de reprodução assistida (HARESIGN, 1992; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2011).

A superovulação é o elemento chave em programas de transferência de embriões, sendo considerada uma técnica eficiente para a obtenção de progênes de fêmeas geneticamente superiores (RUBIANES *et al.*, 1995). Avanços nos protocolos de superovulação, visando múltiplas colheitas em ovelhas de alto valor genético e a redução das variações nas taxas de ovulação e de recuperação de embriões, podem contribuir para o melhor aproveitamento da exploração comercial nos programas de MOTE de pequenos ruminantes.

Várias preparações hormonais para superovulação em cabras e ovelhas, com variações no número de aplicações e na dose dos hormônios utilizados, têm

produzido incremento da taxa ovulatória e, conseqüentemente, do número de embriões recuperados por doadora. Os hormônios utilizados nestes protocolos são o FSH, a eCG e a hMG (FONSECA & BRUSCHI, 2005; OLIVEIRA, 2011) .

De acordo com Armstrong & Evans (1983) a eCG foi amplamente utilizada em programas de transferência de embriões na espécie ovina. Porém, em altas doses, resultou em efeitos negativos em relação ao padrão de liberação de hormônios esteróides e às taxas de ovulação (EVANS e ROBINSON, 1980). Devido a sua meia-vida longa (72 horas), o uso de altas doses de eCG para a indução de superovulação pode provocar a persistência de folículos anovulatórios (COGNIÉ, 1999), efeito que é dependente da dose, do momento de aplicação e da meia-vida do preparado comercial (AZAWI & AL-MOLA, 2011; OLIVEIRA, 2011). A produção de altas quantidades de estradiol por estes folículos pode interferir no ambiente uterino, comprometer a captação dos oócitos pelas fímbrias e o transporte de espermatozoides ao longo do trato reprodutivo feminino, afetando as taxas de fertilização e de recuperação e viabilidade embrionárias (EVANS & ROBINSON, 1980; JABBOUR & EVANS, 1991; MAHMOOD, KOUL, BISWAS, 1991; COGNIÉ, 1999; CHAGAS e SILVA *et al.*, 2003).

Visando eliminar os efeitos negativos associados ao uso de eCG sobre o desempenho reprodutivo das fêmeas e melhorar a eficiência em programas de superovulação, diferentes preparações comerciais de FSH, de origem suína, ovina ou caprina, têm sido utilizadas (OLIVEIRA, 2011). Porém, devido à sua meia vida curta (6 horas), nos protocolos de superovulação são administradas múltiplas doses (6 a 8 doses) consecutivas, em um esquema de duas aplicações diárias a partir de 48 horas antes da retirada do dispositivo de progesterona utilizado para sincronização (ARMSTRONG & EVANS, 1983; EVANS & ARMSTRONG, 1984; MOBINI, HEATH & PUGH, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2008). As dosagens variam em função da espécie (ovelha ou cabra), raça, peso corporal e estação do ano (LOI, *et al.*, 1998; COGNIÉ, *et al.*, 2003; CORDEIRO *et al.*, 2003; FONSECA, 2005).

Tem sido observado que o uso de FSH é eficiente em aumentar a taxa de ovulação e diminuir a incidência de folículos anovulatórios em cabras e ovelhas. Além disso, nas ovelhas tratadas com FSH não se observa hiperestimulação, como descrito nas ovelhas tratadas com eCG, o que pode ser explicado pelo fato de a eliminação do FSH da circulação ser mais rápida.

A proporção de fêmeas com produção de embriões viáveis em ovelhas superovuladas com FSH é maior em relação a de ovelhas tratadas com eCG (100% versus 55%, respectivamente). Portanto, apesar do tratamento com FSH exigir várias aplicações, ele foi considerado a melhor opção para indução da superovulação em ovelhas e cabras (ARMSTRONG & EVANS, 1983), resultando em melhores taxas de ovulação e de fertilização, assim como na produção de embriões de melhor qualidade (COGNIÉ, 1999) .

Resultados de estudos utilizando protocolos tradicionais apontam para a presença de folículos dominantes no início do tratamento superestimulatório com FSH em 70-85% das doadoras (MENCHACA, *et al*, 2007). Com base nesses dados, pode-se observar que esses protocolos tradicionais de superovulação utilizados em pequenos ruminantes não consideram as informações atuais sobre a dinâmica folicular ovariana, levando em conta somente a duração do ciclo estral (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008; MENCHACA, *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2011).

O chamado “protocolo do dia zero” foi desenvolvido a partir dos conhecimentos atualmente disponíveis sobre dinâmica folicular de ovelhas, sendo considerada uma técnica mais eficiente e natural para a sincronização da onda folicular (RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA *et al.*, 2007). No dia zero do ciclo estral (dia da ovulação) todas as ovelhas têm um *pool* homogêneo de pequenos folículos em crescimento e há ausência de folículo dominante. Folículos ovarianos responsivos ao tratamento, quando se encontram em um *status* de maturação similar, no início do tratamento superovulatório, desencadeiam um processo adequado de ovulações múltiplas. Por outro lado, se o *pool* de folículos apresenta uma grande heterogeneidade a resposta é caracterizada por um processo assincrônico do crescimento e da luteinização folicular, sendo considerada uma resposta inadequada (RUBIANES *et al.*, 1997)

Com base nisso, no “protocolo do dia zero” o tratamento com FSH é iniciado após a detecção ultrassonográfica da ovulação ou a partir do momento em que se espera que ela ocorra (dia 0), podendo ser 36 horas após o início do estro ou 48 horas após a aplicação do protocolo de curta duração utilizado para sincronização do cio base (RUBIANES & MENCHACA, 2006).

Observou-se que os tratamentos superovulatórios iniciados 48 horas antes da retirada do progestágeno apresentam boa resposta superovulatória, com uma média de 8 a 10 ovulações por ovelha, que concentram-se entre 48 e 60 horas após início

do tratamento superovulatório (CORDEIRO *et al.*, 2003; AZAWI & AL-MOLA, 2010; OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Para garantir a luteólise, aplica-se PGF_{2α} ao final do “protocolo do dia 0”. O uso deste tratamento resultou em melhores taxas de ovulação ($13,5 \pm 1,4$) e de recuperação de embriões ($7,9 \pm 1,4$) em ovelhas da raça Merino, quando comparado a outro protocolo de sincronização longo (14 dias) com progesterona (troca do CIDR no dia 7) e aplicação de PGF_{2α} no momento da troca do CIDR, seguido da superovulação com FSH 48 horas antes do término do tratamento com progesterona (RUBIANES & MENCHACA, 2006).

Alguns protocolos associam ao tratamento de superovulação uma pequena dose de eCG (200-400UI) no momento da retirada do implante de progesterona, visto que a suplementação com LH exerce papel importante na maturação final dos folículos (MENCHACA *et al.*, 2010). Além disso, em estudo realizado por Naqvi, Gulyani & Pareek (2000), verificou-se que a utilização da eCG associada ao FSH em protocolos de superovulação tende a aumentar a resposta superovulatória, assim como adiantar o início do estro. A antecipação do estro foi atribuída ao fato da eCG ser mais esteroideogênica do que o FSH e assim induzir à uma maior produção de estrógeno pelos folículos pré-ovulatórios.

Além da condição folicular no início do tratamento superovulatório, outro fator que pode afetar a resposta superovulatória e comprometer a produção de embriões é a regressão luteal precoce (RUBIANES *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 2011) e, segundo Fonseca & Simplício (2008), a ocorrência deste fenômeno é exacerbada em cabras e ovelhas superovuladas.

Este evento se caracteriza pelo desencadeamento precoce da cascata luteolítica e, em ovelhas superovuladas, está associado à baixas concentrações de progesterona entre o terceiro e o sexto dia do ciclo estral (LASSOUED *et al.*, 1997). Outro mecanismo que pode estar envolvido com a ocorrência de regressão luteal precoce é a presença de folículos persistentes. Altas doses de FSH ou eCG, nos protocolos de superovulação, podem induzir a um estímulo prolongado sobre os folículos não ovulados, os quais permanecem produzindo estrógeno, levando à persistência de elevadas concentrações deste hormônio durante a fase lútea inicial. A alta concentração de estrógeno está associada com a liberação precoce de PGF_{2α} e regressão luteal (OKADA *et al.*, 2000; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008).

Em ovelhas superovuladas, a incidência de regressão luteal pode apresentar uma grande variação. Em estudos recentes, foram observadas incidências de regressão luteal precoce de 0% em ovelhas da raça Santa Inês (CORDEIRO *et al.*, 2003) e 12,5 a 87,5% em ovelhas Western crossbred (SCHIEWE *et al.*, 1991). Esse fenômeno tem como principal consequência a diminuição na taxa de recuperação e na qualidade dos embriões recuperados (FONSECA, SOUZA & BRUSCHI, 2007). Observou-se que a administração de eCG, associada ao protocolo de superovulação com FSH, pode reduzir a ocorrência de regressão luteal prematura (SCHIEWE *et al.*, 1991; SIMONETTI *et al.*, 2008). O tipo de progestágeno utilizado também pode influenciar na incidência deste fenômeno, já que ovelhas superovuladas e previamente sincronizadas com acetato de fluorogestona (FGA) apresentam maior frequência de regressão prematura de corpo lúteo em relação às ovelhas tratadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) (RUBIANES *et al.*, 1995).

A grande variabilidade individual na taxa de ovulação em resposta a um tratamento superovulatório é um dos fatores mais limitantes para a utilização, em larga escala, da transferência de embriões nos programas de melhoramento de rebanho. Porém, as causas desta variabilidade ainda são discutidas (ARMSTRONG & EVANS, 1983; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2003; SIMONETTI *et al.*, 2008).

Além da influência do perfil folicular ovariano no início das aplicações de FSH sobre a variabilidade das repostas superovulatórias, as preparações hormonais também têm sido associadas a esta variabilidade (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2000; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002d; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008). Entretanto, González-Bulnes *et al.* (2003) constataram que em cabras superovuladas com a mesma preparação hormonal (FSH ovino purificado - Ovagen) houve uma grande variação da resposta entre grupos e entre animais do mesmo grupo. Os mesmos autores sugerem que esta variabilidade seja intrínseca aos agentes superovulatórios disponíveis na indústria de reprodução assistida, devido às variações, por exemplo, entre os lotes de gonadotrofinas utilizados.

No entanto, em estudos prévios, observou-se que essa variação na resposta superovulatória ocorre independente do tipo de hormônio utilizado, do sistema de acasalamento, da dose de progesterona utilizada ou do método de colheita dos embriões (ARMSTRONG & EVANS, 1983; BARI *et al.*, 2000; BARI *et al.*, 2001).

A raça do animal é outro fator que pode influenciar na resposta das fêmeas em relação à taxa de ovulação em programas de superovulação. Segundo

Armstrong & Evans (1983) ovelhas da raça Merino e Suffolk apresentam maior taxa de ovulação ($16,6 \pm 3,7$ e $11,3 \pm 0,9$, respectivamente) quando comparadas com ovelhas da raça Romney Marsh ($8,2 \pm 2,0$), após protocolos de superovulação utilizando FSH e eCG. Ovelhas da raça Santa Inês apresentaram médias entre 9-13 ovulações após superovulação com FSH (CORDEIRO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Porém, observa-se uma grande variação nas taxas de ovulação entre as fêmeas de uma mesma raça (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Distúrbios no pico pré-ovulatório de LH também podem interferir na resposta superovulatória (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992; OLIVEIRA, 2011). Estudos prévios descreveram que o uso de altas doses de FSH exógena em protocolos de superovulação pode provocar alterações na dinâmica ovariana e/ou endócrinas (KAFI & MCGOWAN, 1997), que podem interferir em eventos endócrinos como os pulsos de LH (BEVERS *et al.*, 1989). Os mesmos autores verificaram uma alta variabilidade em relação ao momento do pico de LH em ovelhas superovuladas com múltiplas doses de FSH e, conseqüentemente, o momento das ovulações também apresentou grande variação entre as fêmeas. A condição folicular no início do tratamento superestimulatório também pode influenciar no momento do pico de LH, pois a presença de folículos em fase de crescimento ou dominância adianta o pico de LH e a ovulação (VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008).

Outro fenômeno que pode afetar a resposta superovulatória é a deficiência ou ausência do pico pré-ovulatório de LH após o tratamento com gonadotrofina exógena ou a presença de folículos não responsivos devido a uma baixa regulação dos receptores de LH nas células da granulosa e da teca (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992).

González-Bulnes *et al.* (2002b) verificaram que algumas ovelhas respondem ao tratamento com FSH mas não apresentam o pico pré-ovulatório de LH ou ovulação. Sabe-se que o estímulo pelos tratamentos superovulatórios sobre folículos em fase inicial de atresia está associado a uma inadequada maturação folicular (RUBIANES *et al.*, 1997). Portanto, a deficiência no desenvolvimento e, conseqüentemente, na capacidade esteroidogênica destes folículos pré-ovulatórios pode ser responsável pela ausência do pico de LH, (BAIRD & McNEILLY, 1981).

Além disso, fatores genéticos, condição nutricional, momento do acasalamento e o número de serviços, também podem influenciar na taxa de

ovulação das ovelhas nos programas de reprodução (ARMSTRONG & EVANS, 1983).

2.4. MONTA NATURAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM PROGRAMAS DE MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A fertilização das doadoras em programas de superovulação e transferência de embriões pode ser realizada através da monta natural ou inseminação artificial por laparoscopia com sêmen fresco, resfriado ou congelado (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008; AZAWI & AL-MOLA, 2011).

Na monta natural, o carneiro deve ser colocado com as doadoras por 48 a 72 horas após a retirada do dispositivo de progesterona, a cada 12 horas (CORDEIRO *et al.*, 2003; BALDASSARE, 2008) ou as fêmeas podem ser submetidas ao acasalamento assistido e colocadas com o macho entre 12 e 24 horas após a detecção de cio (MOBINI, HEATH & PUGH, 2005).

Bari *et al.* (2000) observaram que as ovelhas submetidas ao acasalamento por monta natural após protocolo de superovulação com FSH apresentam menores taxas de fertilização em relação às ovelhas inseminadas por laparoscopia (75% versus 82%, respectivamente). Segundo outros estudiosos, as taxas de fertilização das fêmeas acasaladas por monta natural, em programas de MOTE, variam entre 40-100% (NAQVI, GULYANI & PAREEK, 2000; CORDEIRO *et al.*, 2003; AZAWI & AL-MOLA, 2011)

Bari *et al.* (2000) e Naqvi *et al.* (2001) sugerem que o sucesso da fertilização pode ser comprometido por tratamentos hormonais, tanto em protocolos de sincronização quanto nos de superovulação. O uso de progesterona para a sincronização do estro e as altas concentrações de gonadotrofinas exógenas na superovulação interferem no transporte dos espermatozoides ao longo da cérvix nas ovelhas acasaladas por monta natural, resultando, eventualmente, em baixas taxas de fertilização (HAWK, COOPER, & CONLEY, 1987)

Outros fatores não relacionados ao transporte espermático também podem contribuir para a ocorrência de baixas taxas de fertilização: a não captação dos oócitos pelas fímbrias em fêmeas hiperestimuladas; a persistência de altas concentrações de estrógeno produzidos por folículos anovulatórios ou a maturação

anormal de óocitos, que se tornam inviáveis para fertilização (NAQVI, GULYANI & PAREEK, 2000).

Estes fenômenos podem ser atribuídos à associação de eCG aos protocolos de superovulação com FSH. Ovelhas superovuladas apenas com FSH apresentam uma taxa de fertilização de 100% (NAQVI, GULYANI & PAREEK, 2000). Já em fêmeas superovuladas com FSH ovino associado à aplicação de eCG no início do estro, observou-se alta taxa de ovulação (37 ovulações) porém, a taxa de fertilização foi baixa (50,0%).

Portanto, a alta variabilidade em relação à produção de embriões também pode ser associada à falhas na fertilização (COGNIÉ *et al.*, 2003), levando à redução na taxa de recuperação de embriões, principalmente em ovelhas acasaladas por monta natural.

A inseminação artificial realizada por laparoscopia (KILLEEN & CAFFERY, 1982) é uma alternativa que permite a deposição do sêmen nos cornos uterinos, evitando a barreira formada pelo muco cervical (ANEL *et al.*, 2006; FREITAS & RUBIANES, 2008). Dessa forma, por meio desta biotecnologia, evita-se que o ambiente hostil da vagina e da cérvix reduzam a viabilidade dos espermatozoides e prejudiquem a migração espermática (AZAWI & AL-MOLA, 2011), promovendo melhores taxas de fertilização (JABBOUR & EVANS, 1991).

Além disso, a inseminação artificial por laparoscopia é uma ferramenta importante para acelerar o melhoramento genético dos rebanhos em programas de MOTE (HARESIGN, 1992; FERRA & SERENO, 2006), por meio da utilização de machos reprodutores com genética superior, sendo uma das técnicas mais simples utilizadas na reprodução assistida (NUNES & SALGUEIRO, 2011).

A inseminação intrauterina com sêmen congelado deve ser realizada 18 a 24 horas após a detecção do estro (SIQUEIRA *et al.*, 2007) ou entre 48-60 horas após a retirada da esponja (BALDASSARE, 2008) e pode ser repetida entre 6 e 12 horas após (FONSECA, SOUZA & BRUSCHI *et al.*, 2007; SIMPLÍCIO, FREITAS, & FONSECA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012). O número de inseminações irá depender do protocolo utilizado (FONSECA, SOUZA & BRUSCHI, 2007). Quando apenas uma inseminação for realizada, esta deve ser 36 horas após a retirada do dispositivo (GUSMÃO, 2006). Gilberti & Monreal (2008) determinaram que o melhor momento para a inseminação intrauterina por laparoscopia, em ovelhas da raça Santa Inês, é entre 48-60 horas após retirada do implante de progesterona.

Segundo Mobini, Heath & Pugh (2005) a deposição intrauterina de sêmen congelado por laparoscopia 24 horas após a detecção do estro permite a obtenção de bons resultados, por reduzir a ocorrência de falhas na fertilização. O uso de inseminação artificial intrauterina com sêmen fresco diluído foi associado ao aumento da taxa de fertilização e redução da ocorrência de estruturas não fertilizadas ou embriões degenerados em ovelhas de raças europeias, visto que as ovelhas inseminadas e acasaladas por monta natural apresentaram taxas de fertilização de $80,8\% \pm 2,53$ e $69,0\% \pm 4,40$ e de estruturas não fertilizadas/degeneradas de 17,6% e 24,8%, respectivamente (BARI *et al.*, 2000). Os resultados de fertilidade com o uso de inseminação intrauterina com sêmen congelado variam entre 65% e 80% (FERRA & SERENO, 2006).

A inseminação artificial intrauterina apresenta uma grande chance de fertilização mas exige instrumentos caros e mão de obra treinada, dificultando a disseminação da técnica em rebanhos comerciais (MILCZEWSK *et al.*, 2000). Outro fator que também limita o uso desta ferramenta é a pouca oferta de sêmen oriundo de animais geneticamente superiores (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008).

Os resultados de fertilidade das fêmeas inseminadas por meio desta biotecnologia ainda apresentam grande variabilidade, prejudicando o ganho reprodutivo do rebanho. Variáveis ligadas à sazonalidade, à idade, à raça, ao estado reprodutivo, ao tipo de dispositivo de progesterona utilizado, às associações hormonais ou às doses das gonadotrofinas utilizadas nos tratamentos de superovulação são capazes de alterar o intervalo da retirada do tratamento indutor ao estro e à ovulação (COGNIÉ, 1999; NAQVI *et al.*, 2000; MENCHACA *et al.*, 2009), afetando a sincronia entre a ovulação e o momento do acasalamento, seja por monta natural ou por inseminação artificial, o que contribui para a variação das taxas de fertilidade (VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008).

Portanto, para garantir uma fertilidade alta, a inseminação deve ser realizada de forma que os espermatozoides estejam aptos a fecundar quando o oócito for liberado na ovulação e também estiver viável para ser fecundado (PINNA *et al.*, 2008), pois, após a ovulação, o óvulo fica viável por 12-24 horas (AX *et al.*, 2004). Com isso, a determinação do momento da ovulação em relação à retirada do implante de progesterona ou ao início do estro, em ovelhas superovuladas, é uma ferramenta importante para a otimização da fertilidade, principalmente quando a

superovulação estiver associada à inseminação artificial (VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008).

A obtenção de resultados satisfatórios em sucessivos programas de MOTE depende tanto dos resultados das taxas de ovulação quanto das taxas de fertilização e de recuperação de embriões (CORDEIRO *et al.*, 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo:MedVet, 203p., 2008

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E., & de PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in domestic animals*, v.41,Suppl.2, p.30–42, 2006.

ARASHIRO, E. K. N.; FONSECA, J. F.; HENRY, M.; FIGUEIRA, L. M.; MAGÃO, J. V. P.; OLIVEIRA, D. R.; ESTEVES, L. V.; BRANDÃO, F.Z. Efeito do protocolo de sincronização da primeira onda folicular sobre a resposta a superovulação em ovelhas da raça Santa Inês. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte (MG). *Anais... Belo Horizonte:Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. 572p. p.433.*

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G.. Embryo Transfer in Sheep and Goats. *Theriogenology*, v.19 n.1, p.31–42, 1983.

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v.39, n.01, p.7-24, 1993.

AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução animal*. 7ed. Barueri: Manole, 2004. 531 p.

AZAWI, O. I.; AL-MOLA, M. K. M. A.. A study on superovulation using FSH and eCG in Awassi ewes. *Tropical animal health and production*, v.42, n.5, p.799–801, 2010.

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 superovulation. *Tropical animal health and production*, v.43, n.7, 1351–1355, 2011.

BALDASSARE, H. Coleta e transferência de embrião. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet., 2008, 203p. Cap.11, p.143-152.

BAIRD D.T.; McNEILLY A.S. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl 30, p.129–133, 1981.

BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERREL, B. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose, and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. *Theriogenology*, v.53, n.99, p.727–742, 2000.

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

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A., RAWLINGS, N.C. 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, p.111–124, 1999.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. *Theriogenology*, v. 54, p.229–245, 2000.

BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L.. Reproductive cycles in sheep. *Animal reproduction science*, v.124, n.3-4, p.259–68, 2011.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. *Domestic animal endocrinology*, v.29, n.2, p.305–317, 2005.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; BLANKESTEIN, D. M.; VAN TOL, H. T. M.; BROEK, J. Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.87, p.745–754, 1989.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D. B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovinos refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.120-127, 2003.

BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA, B. D.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, Supl. 1, p.127–130, 2005.

BUENO, M.S.; CUNHA, E.A.; SANTOS, L.E. Santa Inês sheep breed in the intensive lamb meat production in the southeast regions of Brazil. In: GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL RESOURCES, 5, 2000. Brasília: Embrapa, 2000.

CARDWELL, B.E.; FITCH, G.Q.; GEISERT, R.D. Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by pregnant mare's serum gonadotropin. *Journal of Animal Science*, v.76, p.2235-2238, 1998.

CAVALCANTI, A. S.; FONSECA, J. F.; NOGUEIRA, L. A. G.; BRANDÃO, F. Z.; SILVA, A. L. S.; PINHO, T. G.; PINNA, A. E.; CARVALHO, B.C. Effect of GnRH on pregnancy rates in ewes short progestagens synchronization estrous. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, Supl. 1, p.384, 2006.

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

CHAGAS e SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L.; CIDADÃO, R.; ROBALO SILVA, J. 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, n.3, p.521–532, 2003.

COGNIÉ, Y. State of the Art in Sheep-Goat Embryo Transfer *Theriogenology*. *Theriogenology*, v.51, p.105–116, 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59. n.1, p.171–188, 2003.

CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, J. B.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FARIAS, L. N.; SALLES, H. O.; SIMPLÍCIO, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research*, v. 49,n.1, p,19–23, 2003.

CUNHA, E. A.; BUENO, M. S.; SANTOS, L. E.; RODA, D. S.; OTSUK, I. P. Desempenho e características de carcaças de cordeiros Suffolk alimentados com diferentes volumosos. *Ciência Rural - Santa Maria*, v.31, n.3, p.671-676, 2001.

DA COSTA, R. L. D. Aspecto Reprodutivo das Ovelhas. *Pesquisa & Tecnologia*, v.4, n.6, 12p., 2007. Disponível em:<<http://www.aptaregional.sp.gov.br>>. Acessado em: 20 set. 2012.

DIESEL, W.R. Perspectivas econômicas da ovinocultura. In: SIMPÓSIO DE CAPRINOS E OVINOS DA EV-UFMG, 2, 2007, Belo Horizonte. Anais..., Belo Horizonte:CENEx/EV-UFMG, 2007. 195p. p.1-28.

DRIANCOURT, M. A.; BODIN, L.; BOOMAROV, O.; THIMONIER, J.; ELSSEN, J. M. Number of mature follicles ovulating after a challenge of human chorionic gonadotropin in different breeds of sheep at different physiological stages. *Journal of Animal Science*, v.68, p.719-724, 1990.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance in ewes? *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.63–70, 1991.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211–1239, 2001.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P. M.; BARRETT, D. M. W.; RAWLINGS, N. C., 2003. 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, p.495–510.

EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M. P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, v.53, p.699–715, 2000.

EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in domestic animals*, v.38, n.4, p.240–246, 2003.

EVANS, G. Physiology of Reproduction in Ewes and Does. In: _____ *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney: Butterworths, 1952. 194p. cap.6, p. 37-54.

EVANS, G.; ROBINSON, T. J. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *The Journal of Agricultural Science*, v.94, n.1, p.69–88, 1980.

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.

FERRA, J. C.; SERENO, J. R. Inseminação Artificial em Ovinos (Documento 156). Planaltina (DF): Embrapa Cerrados, 2006, 26p. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia (GO). Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, p.1–9 (Palestras).

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Revista de Ciências Agrárias de Belém*, v.43, p.1–13, 2005.

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-UFGM, 2, 2007, Belo Horizonte-MG. Anais...* Belo Horizonte: Cenex-EV/UFGM, 2007. 195p. p.167-195.

FONSECA, J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. In: *ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1., 2008, Belém, PA. Meio Ambiente e pecuária: Anais...* Belém, PA: FAEPA, Instituto Frutal, SEBRAE, PA, 2008. 21f. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/918145>>. Acesso em 11 nov. 2011.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, E. C. O. et al. Differentiation dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology Reproduction*, v. 65, p.648-654, 2001.

FREITAS, V. J. F.; RUBIANES, E. Preparação das fêmeas: detecção e controle do estro e da ovulação. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.7, p.89-100.

GIBBONS, J. R.; KOT, K.; THOMAS, D. L.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology*, v. 52, p.1005–1020, 1999.

GILBERTI, M.; MONREAL, A. C. D. Identificação do intervalo de tempo fixo para o emprego da inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado em ovelhas Santa Inês. *Agrarian*, v.1, n.2, p.123–132, 2008.

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, p.699–703, 1995.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. et al. Selection of dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1187–1194, 1996.

GINTHER, O. J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, .K. Follicle selection in monovular species. *Biology Reproduction*, v. 65, p. 638–647, 2001.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, v.54, p.1055–1064, 2000.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J.. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v.58, n.8, p.1607–1614, 2002a.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J.; BAIRD, D. T. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reproduction in domestic animals*, v.37, n.6, 357–361, 2002b.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J. H.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D.T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*, v.57, n.4, p.1263–72, 2002c.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCÍA-GARCÍA, R. M.; COCERO, M. J.; LÓPEZ-SEBASTIAN, A. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes (Revisión). *Investigación agraria: producción y sanidad animal*, v.17, n.1-2, p.37–48, 2002d.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J. A.; DÍAZ-DELFA, C.; GARCIA-GARCIA, R. M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant Research*, v.48, n.1, p.9–14, 2003.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; COCERO, M. J.; GARCÍA-GARCÍA, R. M.; INSKEEP, E.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; MCNEILLY, A.S.; SANTIAGO-MORENO, J.; SOUZA, C.J.H.; VEIGA-LÓPEZ, A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, fertility, and development*, v.16, n.4, p.421–35, 2004a.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Animal reproduction science*, v.84, n.1-2, p.107–19, 2004b.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M. A.; TRESGUERRES, J. A. F.; COCERO, M. J.; FLORES, J. M. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*, v.63, n.9, p.2523–2534, 2005

GONZALEZ F.H.D. *Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária*. UFRGS, 2002, 87p.

GORDON, I. A. N. *Controlled Reproduction in Sheep & Goats*. Volume 2. New York/USA: CAB International, 1997. 450 p.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; & SALES, M. P. *Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos*. Campos dos Goytacazes, RJ: PROEX/UENF, 2006. 54p.

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

GUSMÃO, A. L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. *O Embrião*, nº 25, p. 6–9, 2006.

HAFEZ, E. S. E. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *The Journal of Agricultural Science*, v. 42, p.189-231, 1952.

HARESIGN, W. Manipulation of reproduction in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supl. 45, p.127-139, 1992.

HAWK, H. W.; COOPER, B. S.; CONLEY, H. H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology*, v.28, n.2, p.139–153, 1987.

IBGE- Censo Agropecuário 2006 e 2010: Produção de Pecuária Municipal. www.ibge.gov.br. Disponível em 20/01/2013 17:50.

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. *Animal Reproduction Science*, v.26, n.1-2, p.93–106; 1991.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.48, p.137–157, 1997.

KILLEEN, I. D.; CAFFERY, G. J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal*, v.59, p.95-96, 1982.

LANGFORD, G. A. Influence of PMSG and Time of Artificial Insemination on Fertility of Progesterone-Treated Sheep in Confinement. *Journal of Animal Science*, v.54, n.6, p.1205–1211, 1982.

LASSOUED, N.; KHALDI, G.; CHEMINEAU, P.; CONIÉ, Y.; THIMONIER, J. Role of uterus in early regression of corpora lutea induced by ram effect in seasonally anoestrous Barbarine ewes. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.37, p.559-571, 1997.

LEYVA, V.; WALTON, J. S.; BUCKRELL, B. C.; BUHR, M. M.; KING, W. A.; GARTLEY, C. Ultrasound examination of ovarian activity and ovulation regulated by exogenous progesterone in cycling ewes. *Journal of Animal Science*, v.73, n.1, p.226, 1995.

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

LINDSAY, D. R.; FLETCHER, I. C. Ram-seeking Activity Associated with Oestrous Behaviour in Ewes. *Animal Behaviour*, v.20, n.33, p.452–456, 1972.

LOI, P.; PTAK, G.; DATTENA, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; CAPPAL, P. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. *Reproduction, Nutrition and Development*, v.38, p.615-628, 1998.

LOPEZ-DIAZ, M. C.; BOSU, W. T. K. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology*, v.37, p.1163–1183, 1992.

LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination. *Theriogenology*, v.55, n.01, p.1797–1805, 2001.

MAHMOOD, S.; KOUL, G.L.; BISWAS, J.C. Comparative efficacy of FSH-P and PMSG on superovulation in Pashmina goats. *Theriogenology*, v.35, n.6, p.1191-1196, 1991.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, v.68, n.8, p.1111–1117, 2007.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v.72, n.4, p.477–483, 2009.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, fertility, and development*, v.22, n.1, p.113–118, 2010.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L. E.; LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Archives of veterinary Science*, v.5, p.35–39, 2000.

MOBINI, S.; HEATH, A. M.; PUGH, D. G. Teriogenologia de Ovinos e Caprinos. In: PUGH, D.G. *Clinica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: Roca, 2005. 513p. Cap. 6, p.145-208.

MORAES J.C.F.; SOUZA C.J.H. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos, In: GONÇALVES P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. 340p. Cap.3, p.25-55.

MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatômicas e funcionais do sistema reprodutor da fêmea. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.2, p.11-25.

NAQVI, S. M. K.; GULYANI, R.; PAREEK, S. R. Effect of superovulatory regimens on ovarian response and embryo production in fine wool sheep in tropics. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v.13, n.5, p.595–599, 2000.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Research*, v.39, n.3, p.199–208, 2001.

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, p.695–700, 1993.

NOGUEIRA, D. M.; ELOY, A. M. X.; DE SÁ, C. O.; JÚNIOR, E. S. L.; FIGUEIREDO, H. O. S.; DE SÁ, J. L.; SOUSA, P. H. F. Manejo Reprodutivo. In: *Produção de caprinos e ovinos no semiárido*. Petrolina, Embrapa semiárido: Voltolini, 2011. 420p. p.385–420.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminant Research*, v.98, p.176-184, 2011.

OKADA, A.; KAMADA, S.; JEON, C. W.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, n.6, p.397–402, 2000.

OLIVEIRA, M. E. F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, Supl. 1, p.29–35, 2011.

OLIVEIRA, M. E. F.; CORDEIRO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SOUZA, S. F.; PIERONI, J. S. P.; RODRIGUES, L. F. S.; FONSECA, J. F. F.; VICENTE, W.R.R. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? *Ciência Rural*, v.42, n.6, p.1077–1082, 2012.

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

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, v.21, n.3, p.495-504, 1984.

PINNA, A. E.; BRANDÃO, F. Z.; CAVALCANTI, A. S.; BORGES, A. M.; LOUREIRO, A. A. P.; FONSECA, J. F. Fertilidade de ovelhas cíclicas submetidas à sincronização do estro utilizando implantes intravaginais (CIDR) novos ou reutilizados. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, n.2, p.581, 2008.

PIRES, B. C.; VIU, M. A. O.; LOPES, D. T.; DE PAULA, E. J. H.; CRUZ, M. M.; VIU, A. F. M. Métodos para elevar o ritmo reprodutivo dos ovinos. *PUBVET-Publicações em Medicina Veterinária*, v.5, n.11, p.1–24, 2011.

RAJAKOSK, E. The ovarianfollicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinology*, v.34, p.7-68, 1960.

RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.110, p.279–289, 1997.

RUBIANES, E.; IBARRA, D., UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrous ewes affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, v.43, p.465–472, 1995.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES, C.; RIVERO, A.; ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitores ewes. *Theriogenology*, v.47, p.1479–1488, 1997.

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, 2003.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Follicular Dynamics, oestrous synchronisation and superovulation in sheep. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, Suppl. 1, p.251–261, 2006.

SCHIEWE, M. C.; FITZ, T. A.; BROWN, J. L.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Relationship of oestrus synchronization method , circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2 α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.19–30, 1991.

SENGER, P. L. Reproductive Cyclicity –Terminology and Basic Concepts. In:_____ *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2^aed. USA: Cadmus Professional Communications, 1999. 368p. Cap. 7, p.144-163.

SHISONG, C.; WRATHALL, A. E. The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. *Brasilian Veterinary Journal*, v.145, p.129–140, 1989.

SILVA, A. E. D.; NUNES, J. F.; RIERA, G. S.; FOOTE, W. C. Idade, peso e taxa de ovulação à puberdade de ovinos deslanados no nordeste do Brasil. Embrapa, CNPC, v.5, 17p., 1987.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal reproduction science*, v.104, n.2-4, p.227–37, 2008.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.234–246, 2007.

SIQUEIRA, A. P.; FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; PALHARES, M. S.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio a base de gema de ovo. *Acta Scientiae Veterinary*, v.35, n.3, p.1036, 2007.

SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J. Reprod. Fertil.* 108: 101-106, 1996.

SOUZA, J. M. G.; GOMES, L. M.; MONTEIRO Jr, P. L. J.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F. *Uso de protocolos curtos de indução de estro em ovelhas Santa Inês*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba. *Anais...* Curitiba, 2007. p.215.

TRALDI, A. D. S.; FERNANDA, M.; LOUREIRO, P.; CAPEZZUTO, A.; MAZORRA, A. L. Métodos de controle da atividade reprodutiva em caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.254–260, 2007.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; CADAVID, R. R.; OSORIO, J. H. Respostas foliculares e endócrinas em ovelhas após sincronização do estro usando progesterona, prostaglandinas (PGF 2 α) e gonadotrofinas. *Vet. Zootec.*, v.3, n.2, p.14–27, 2009.

VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; DE CARVALHO, B. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A.; HENRY, M. R. J. M. Biotécnicas da reprodução aplicada a pequenos ruminantes. *Brazilian Animal Science*, v.8, Supl. 1, p.1–17, 2009.

VEIGA-LOPEZ, A.; ENCINAS, T.; McNEILLY, A. S.; GONZALES-BULNES, A. 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, 2008.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G. et al. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. 14th International Congress on Animal Reproduction, p. 32 (abstr), 2000.

WALKER, S. K.; SMITH, D. H.; FRENHAM, A.; ASHMAN, R. J.; SEAMARK, R. F. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology*, v.31, n.4, p.741–752, 1989.

WHERMAN, M. E.; ROBERSON, M. S.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; STUMPF, T. T.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17β -estradiol and increases conception in cows. *Biology of Reproduction*, v.49, p.214-20, 1993.

CAPÍTULO 1

Superovulação em ovelhas da raça Santa Inês:

Efeito do protocolo de sincronização da onda folicular sobre a resposta ovariana ao tratamento superovulatório e sobre a qualidade das estruturas recuperadas.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tipo de protocolo de sincronização da onda folicular sobre a resposta ovariana ao tratamento superovulatório e sobre a qualidade das estruturas recuperadas. O experimento foi realizado no Estado do Rio de Janeiro (22° 27'S, 43° 39'O). Foram utilizadas 15 ovelhas da raça Santa Inês, multíparas, de 2 a 5 anos de idade, apresentando peso médio de $46,33 \pm 6,24$ kg e escore da condição corporal médio de $2,96 \pm 0,32$. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos (G_1 , G_2 e G_3) ($n=5$ /grupo/etapa), sendo que cada animal passou por todos os tratamentos, totalizando 15 animais por grupo. No G_1 , para a sincronização do cio base, inseriu-se (Dia 0) um dispositivo vaginal impregnado com 60mg de acetato de medroxiprogesterona, que foi mantido por quatorze dias. O protocolo de superovulação foi iniciado no dia 12. As fêmeas dos G_2 e G_3 tiveram o cio base sincronizado com o dispositivo vaginal de progestágeno que permaneceu por seis dias (D0-D6) e no D5 aplicou-se 300 UI de eCG e 5mg de dinoprost via intramuscular (i.m.). As ovelhas do G_3 receberam 0,025mg de GnRH i.m. 12 horas após a retirada do dispositivo. Nos grupos G_2 e G_3 , o tratamento superovulatório foi iniciado 48 horas após o fim do protocolo de sincronização do cio base. Para todos os grupos, o tratamento superovulatório consistiu na aplicação de 200mg de FSHp i.m. em 6 doses decrescentes (50/50, 30/30 e 20/20 mg), a cada 12 horas. No momento da aplicação da primeira dose de FSHp, foi inserida uma nova esponja vaginal nos G_2 e G_3 . Na quinta dose de FSHp, as ovelhas de todos os grupos receberam 5mg de dinoprost i.m. e realizou-se a retirada da segunda esponja dos grupos G_2 e G_3 . As coberturas foram iniciadas após a última dose de FSHp, utilizando machos de fertilidade conhecida e o macho era colocado com as fêmeas no final da tarde e retirado na manhã do dia seguinte, até o final do estro. Sete dias após as coberturas, realizou-se a colheita de embriões por laparotomia nas ovelhas que apresentaram mais de quatro CLs na avaliação laparoscópica. A porcentagem de animais que responderam ao tratamento superovulatório (>4 CLs) foi de 60,00% (9/15), 40,00% (6/15) e 57,14% (8/14) nos grupos G_1 , G_2 e G_3 , respectivamente. O número de CL ($9,72 \pm 5,25$; $6,14 \pm 5,76$ e $8,45 \pm 5,31$) e de estruturas coletadas ($8,44 \pm 4,39$; $9,50 \pm 6,35$ e $11,75 \pm 10,29$) nos G_1 , G_2 e G_3 , respectivamente, não diferiu ($P>0,05$). O número de embriões viáveis recuperados, também não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos ($6,00 \pm 4,72$; $3,83 \pm 6,40$ e $7,50 \pm 6,52$, nos G_1 , G_2 e G_3 , respectivamente). A resposta superovulatória e a qualidade das estruturas recuperadas, em ovelhas da raça Santa Inês, não foram afetadas pelo tipo de protocolo de sincronização utilizado.

Palavras-chave: Protocolos de sincronização. Superovulação. Monta natural. Produção de embriões.

ABSTRACT

The effect of different follicular wave synchronization protocols on ovarian ovulatory response and on the quality of recovered embryos was assessed in superovulated sheep. Fifteen pluriparous Santa Inês sheep, aging between 2 and 5 years old, average body weight of $46,33 \pm 6,24$ kg and body condition score of $2,96 \pm 0,32$ were randomly assigned into three groups (G_1 , G_2 and G_3) ($n=5/\text{group}$) and all ewes were submitted to all treatments ($n=15/\text{group}$). In G_1 , the ewes were synchronized using intravaginal sponges containing 60mg of medroxyprogesterone acetate for 14 days (D0-D14). The superovulatory treatment started on day 12. The ewes of the G_2 and G_3 were synchronized using intravaginal sponges for 6 days (D0-D6). On D5, ewes of the G_2 and G_3 received 300UI of eCG and 5mg of dinoprost i.m. The ewes of the G_3 also received 0,025mg of GnRH i.m. 12 hours after the sponge withdrawal. In G_2 and G_3 the superovulatory treatment started 48 hours after the end of the synchronization protocol. At the first dose of pFSH, a new sponge was inserted on the ewes of G_2 and G_3 . The superovulatory protocol in all groups consisted of 200mg of pFSH administered i.m. at 12 hours intervals in 6 decreasing doses (50/50, 30/30 and 20/20 mg). At the time of the fifth dose of pFSH, 5mg of dinoprost was administered i.m. in all groups and the second sponge was removed from the ewes of G_2 and G_3 . The mating began after the last dose of pFSH using one Santa Inês ram of proven fertility and the ewes were bred at 12 hours interval until the end of the estrus. Seven days after the mating, the number of CL was evaluated by laparoscopy and the embryo collection by laparotomy was performed in the females with more than 4 CLs. The percentage of ewes that responded to superovulation ($>4\text{CLs}$) was 60% (9/15), 40% (6/15) and 57,14% (8/14), in G_1 , G_2 e G_3 , respectively. The number of CL ($9,72 \pm 5,25$; $6,14 \pm 5,76$ and $8,45 \pm 5,31$, in G_1 , G_2 , and G_3 , respectively) and number of the recovered structures ($8,44 \pm 4,39$; $9,50 \pm 6,35$ and $11,75 \pm 10,29$, in G_1 , G_2 , G_3 , respectively) was not different ($P>0,05$) among the three groups. Also, there was no difference ($P>0,05$) in the number of transferable embryos among G_1 ($6,00 \pm 4,72$), G_2 ($3,83 \pm 6,40$) and G_3 ($7,50 \pm 6,52$). The superovulatory response and the quality of the recovered embryos was not affected by the synchronization protocol.

Key-words: Synchronization protocols. Superovulation. Natural mating. Embryo yield.

1. INTRODUÇÃO

Os programas de MOTE têm sido extensamente aplicados na produção de ovinos visando obter o maior número possível de embriões a partir de doadoras geneticamente superiores e, assim, acelerar o ganho genético dos rebanhos (BARI *et al.*, 2003; COGNIE *et al.*, 2003).

O principal fator limitante nos programas de MOTE é a grande variabilidade das respostas superovulatórias e da produção de embriões viáveis e tem sido observada entre tratamentos e entre fêmeas submetidas ao mesmo tratamento (COGNIE, 1999; COGNIE *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a). A condição folicular ovariana no início do tratamento superovulatório é determinante no sucesso dos programas de MOTE, ou seja, independente da origem do hormônio e do protocolo de administração, as taxas de ovulação e, conseqüentemente, de produção de embriões estão fortemente relacionadas com o número de folículos responsivos presentes no ovário no início do tratamento superovulatório com FSH. Assim, a resposta ovariana ao tratamento com FSH em ovinos está positivamente correlacionada com o número de pequenos folículos (2-3mm) e negativamente associada com a presença de folículos grandes no primeiro dia de administração da gonadotrofina (RUBIANES *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002b; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004b).

Uma estratégia que tem sido utilizada para sincronizar a ovulação, possibilitando iniciar a superovulação no dia 0 do ciclo, ou seja, no momento da emergência da primeira onda folicular e na ausência de um folículo dominante, é o uso do protocolo curto com dispositivos intravaginais de progestágeno. Associado à sincronização com progestágeno, utiliza-se a aplicação de PGF_{2α} e 200 a 300 UI de eCG antes da retirada do dispositivo e administração de GnRH após o término do tratamento com progesterona, antes do início do tratamento com gonadotrofina. (FONSECA, 2005; RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA *et al.*, 2010). O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de três protocolos de sincronização da onda folicular sobre a resposta ovariana ao tratamento superovulatório e sobre a qualidade das estruturas recuperadas.

2 . MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animal da Universidade Federal Fluminense, sob protocolo 062/08 (Anexo 1)

2.1. LOCAL, DELINEAMENTO E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Escola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada na cidade de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (22° 27' latitude sul, 43° 39' longitude oeste). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é classificado como Af, caracterizando-se por inverno seco e verão chuvoso, temperatura anual entre 18 e 23°C e precipitação pluviométrica anual variando de 2.000 a 2.600mm³. Foram utilizadas 15 ovelhas da raça Santa Inês, as quais foram submetidas a três protocolos de superovulação distintos associados ao acasalamento por monta natural, sendo que cada protocolo equivaleu a um grupo experimental (Tabela 1). Dessa forma, o experimento foi executado em três etapas, sendo a primeira em outubro de 2008, a segunda em dezembro de 2008 e a terceira em fevereiro de 2009, totalizando 15 repetições por tratamento, já que todas as fêmeas foram submetidas a todos os tratamentos (n=5/grupo/etapa).

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos Experimentais (n=15)	
G₁	Protocolo de superovulação longo
G₂	Protocolo de superovulação curto sem uso de GnRH na sincronização
G₃	Protocolo de superovulação curto com uso de GnRH na sincronização

2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

2.2.1. Ovelhas

Foram selecionadas quinze ovelhas da raça Santa Inês, pluríparas, entre 2 e 5 anos de idade, apresentando peso médio de 46,33 ± 6,24 kg e escore da condição corporal médio de 2,96 ± 0,32. Antes do início do estudo, as fêmeas foram

submetidas ao exame ginecológico por meio da ultrassonografia transretal em tempo real e nenhuma anormalidade reprodutiva foi observada.

2.2.2. Carneiros

Três carneiros da raça Santa Inês com fertilidade conhecida, não apresentando nenhum sinal clínico de disfunção orgânica ou reprodutiva, conforme prévio exame clínico e andrológico, foram selecionados como reprodutores.

2.2.3. Sincronização do cio base e superovulação

Os animais foram, aleatoriamente, distribuídos em três grupos: G₁, G₂ e G₃ (n=5/grupo/etapa). No G₁, para a sincronização do cio base, foi inserida (Dia 0) uma esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], Schering Plough, São Paulo, Brasil), que foi mantida por quatorze dias. O protocolo de superovulação foi iniciado no dia 12 (48 horas antes da retirada do dispositivo). Nos grupos G₂ e G₃ também foi inserida (Dia 0) uma esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®]); no entanto, a esponja foi mantida por apenas seis dias. Ainda nas fêmeas dos grupos G₂ e G₃, no dia 5 foram administrados 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®], Schering Plough, São Paulo, Brasil) e 5 mg de dinoprost (Lutalyse[®], Pfizer, São Paulo, Brasil) via intramuscular. Somente nas ovelhas do G₃ foi administrado 0,025 mg de Lecirelina (Análogo do GnRH - Gestran Plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) via intramuscular, 12 horas após a retirada da esponja de progesterona. Nos grupos G₂ e G₃, o tratamento superovulatório iniciou-se 48 horas após o fim do protocolo de sincronização do cio base.

Para todos os grupos, o tratamento superovulatório consistiu na aplicação de 200 mg de FSHp (Folltropin-V[®], Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) via intramuscular, em 6 doses decrescentes (50/50, 30/30 e 20/20 mg) com um intervalo de 12 horas entre cada dose. No momento da aplicação da primeira dose de FSHp, foi inserida uma nova esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®] - Schering Plough, São Paulo, Brasil) nos grupos G₂ e G₃. Na aplicação da quinta dose de FSHp, as ovelhas de todos os grupos receberam 5 mg de dinoprost (Lutalyse[®], Pfizer, São Paulo, Brasil) via intramuscular

e realizou-se a retirada da segunda esponja vaginal dos grupos G₂ e G₃. Os esquemas dos protocolos hormonais dos grupos experimentais estão representados na Figura 1.

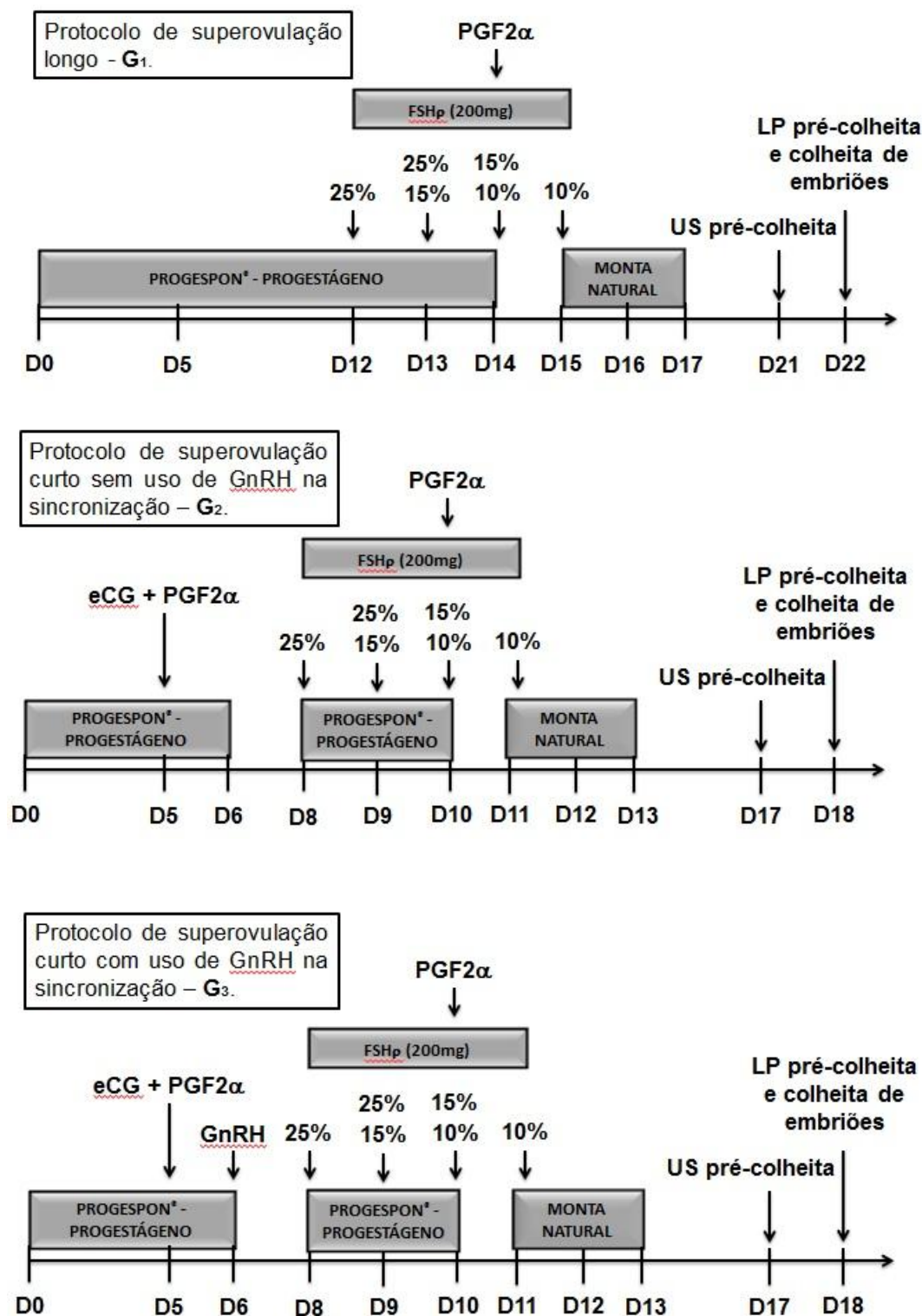


Figura 1. Esquema dos protocolos hormonais para sincronização do estro e superovulação em ovelhas Santa Inês nos três grupos experimentais.

2.3. OBSERVAÇÃO DO ESTRO E MONTA NATURAL

Para avaliação do comportamento sexual das fêmeas e realização das coberturas, ao final do protocolo de superovulação, foi colocado um carneiro com cada grupo experimental a cada 12 horas, sendo que eles permaneciam com as fêmeas durante a noite e eram retirados na manhã do dia seguinte. As fêmeas foram observadas em relação aos sinais de manifestação do cio (aproximação do macho, ficar imóvel perto do macho, urinar, aceitar a monta) e, a cada dia, os carneiros tiveram a região peitoral pintada com tinta xadrez de cor diferente, permitindo a identificação do início e final do estro. A cada dia, os carneiros eram alternados entre os grupos.

Os procedimentos de detecção do estro e cobertura foram iniciados no dia da aplicação da última dose de FSH_p e repetidos até o final do estro (Figura 1). As informações sobre o comportamento sexual dos animais e as coberturas foram registradas em fichas próprias (Anexos 3, 4 e 7).

2.4. ULTRASSONOGRAFIA

Realizou-se o acompanhamento da dinâmica folicular ovariana em todas as ovelhas, de cada grupo experimental, durante os tratamentos de sincronização e superovulação para monitorar, desta forma, o desenvolvimento folicular e, conseqüentemente, determinar o número de folículos ovulados e não ovulados, o período de ocorrência das ovulações e o número de corpos lúteos formados (Anexos 5 e 7). Este acompanhamento foi feito pelo mesmo operador, por meio da ultrassonografia transretal, com auxílio de um transdutor linear de 5,0 MHz (Aloka, modelo SSD-500, Tóquio, Japão). O transdutor linear foi adaptado com um tubo rígido e fita adesiva, permitindo a introdução no reto das ovelhas e sua manipulação externamente. Durante os exames, as ovelhas foram mantidas em estação e a parede abdominal foi comprimida para facilitar a visualização do útero e dos ovários. O transdutor foi lubrificado com, aproximadamente, 5 mL de gel e introduzido no reto com a superfície de contato paralela à parede abdominal. Identificada a bexiga, os cornos uterinos foram localizados e o transdutor foi lentamente girado para a esquerda e para a direita a fim de se observar os ovários e suas estruturas. No grupo G₁, as avaliações foram realizadas a cada 24 horas, após a inserção da

esponja, e a cada 12 horas, após a primeira dose de FSHp, até a detecção da ovulação. Nos grupos G₂ e G₃, as avaliações ultrassonográficas foram realizadas a cada 24 horas, após o início do protocolo de sincronização do cio base, e a cada 12 horas, após a retirada da esponja, até a confirmação da ovulação (Anexos 5 e 7). A ovulação era determinada quando não se visualizava mais o folículo pré-ovulatório entre duas ultrassonografias consecutivas.

2.5. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA PRÉ-COLHEITA DE EMBRIÕES

Um dia antes da laparotomia para colheita dos embriões, foi feita uma avaliação ultrassonográfica nas ovelhas utilizando os mesmos equipamentos e procedimentos descritos anteriormente (item 2.4). Esta avaliação teve como objetivo observar e quantificar o número de corpos lúteos e folículos não ovulados (Anexos 5 e 8).

2.6. COLHEITA DE EMBRIÕES

2.6.1 Laparoscopia pré-colheita de embriões

Sete dias após a última dose de FSH, os embriões foram coletados por meio da lavagem uterina cirúrgica utilizando o método da laparotomia longitudinal mediana retroumbilical.

Imediatamente antes da colheita, os animais foram submetidos a uma laparoscopia para a avaliação dos ovários em relação à presença e quantidade de corpos lúteos e folículos não ovulados. Os corpos lúteos também foram caracterizados quanto à cor e ao grau de irrigação. Antes do início da laparoscopia, foi realizada a tricotomia e a antisepsia no local das incisões. Para este procedimento, utilizou-se, primeiro, clorexidina degermante (Riohex[®] Degermante 2%, Rioquímica, São Paulo, Brasil) e, em seguida, clorexidina alcoólica (Riohex[®] Alcoólico 0,5%, Rioquímica, São Paulo Brasil). As ovelhas foram posicionadas em decúbito dorsal, em macas apropriadas, com angulação aproximada de 45⁰, sendo a cabeça mantida mais baixa em relação ao restante do corpo (posição de *Trendelenburg*). Desta forma, preveniu-se a ocorrência de refluxo e, consequentemente, a asfixia dos animais.

Foram feitas duas incisões pontuais na pele com lâmina de bisturi, paralelamente à linha alba, sendo uma em cada lado a, aproximadamente, 6 cm da linha média ventral e 3 cm a frente do úbere, por meio das quais foram inseridos os dois trocartes: um trocarte no lado esquerdo para a passagem da óptica de 5 mm e 30° (Óptica de laparoscopia, Karl Storz®, Alemanha) e visualização do aparelho reprodutivo e o outro no lado direito, destinado à passagem da pinça atraumática BabCok (33533BL Karl Storz®, Alemanha). Assim, os cornos uterinos foram tracionados para a visualização dos ovários e verificação da resposta ao estímulo hormonal por meio da contagem de corpos lúteos.

Os dados foram registrados em fichas específicas (Anexo 8) e somente aqueles animais que apresentaram mais de quatro corpos lúteos funcionais, observados na laparoscopia, foram considerados como responsivos ao tratamento de superovulação e submetidos à laparotomia para a colheita de embriões. Nos animais que não responderam ao tratamento superovulatório, foi feito o curativo no local de inserção dos trocartes (spray com cloridrato de oxitetraciclina e hidro cortisona; unguento veterinário - óxido de zinco, óleo de pinho, caulim e xilol - e spray com fenitroton, cloridrato de clorexidina e alumínio).

2.6.2. Colheita de embriões

Os animais com mais de quatro corpos lúteos foram, imediatamente, submetidos ao procedimento de laparotomia para realização da colheita de embriões. No campo cirúrgico destinado ao procedimento de laparotomia (região abdominal caudal) realizou-se a tricotomia e a antisepsia (como descrito, anteriormente, no item 2.6.1). Em seguida, foram colocados panos de campo para proteger o local da laparotomia. Foi feita uma incisão de, aproximadamente, 4 cm, localizada na linha alba e a 3 cm a frente do úbere. Após a identificação, o útero foi cuidadosamente tracionado, permitindo a exposição dos cornos uterinos e, em seguida, foi efetuada a lavagem de cada corno uterino.

Para este procedimento, foi introduzida uma sonda de foley número 8 (Embramac®, São Paulo, Brasil) na porção proximal do corno uterino, próximo à junção útero-tubárica, que teve o balão inflado para evitar refluxo de líquido. Na porção distal do corno uterino, colocou-se um cateter 18G (BD®, New Jersey, EUA) por onde o meio DMPBS (Solução fosfatada tamponada modificada por Dulbecco),

de Dulbecco & Vogt, modificado por Whittingham (1971), previamente aquecido a 37°C, foi injetado, permitindo a formação de um fluxo de líquido contínuo pelo corno até sua saída pela sonda de foley. Foi utilizado um volume total de 40 mL de meio DMPBS por corno lavado. Durante a colheita, os cornos uterinos foram constantemente irrigados externamente com solução fisiológica acrescida de heparina sódica (Liquemine[®], Roche, Rio de Janeiro, Brasil), a 37°C. O líquido recuperado de cada corno foi, separadamente, armazenado em placas de Petri (100 x 20 mm) para posterior avaliação das estruturas recuperadas.

Após o procedimento de colheita, os cornos foram lubrificados com pomada de heparina sódica (Trombofob[®], Abbott, São Paulo, Brasil) e inseridos na cavidade abdominal que também foi irrigada com solução de heparina, visando minimizar a formação de possíveis aderências. Em seguida, as camadas muscular, subcutânea e dérmica foram suturadas, separadamente, em três diferentes planos, utilizando fio Vicryl 0 com ponto em Wolf, fio Vicryl 0 com ponto simples e Nylon 0 com ponto em Wolf, respectivamente.

Terminado o procedimento, as ovelhas foram levadas para as baias onde receberam alimento e água *ad libitum* e permaneceram por uma semana para a realização diária do curativo (solução antisséptica de iodopovidona e spray com fenitroton, cloridrato de clorexidina e alumínio) e administração da medicação pós-cirúrgica. Todas as doadoras receberam duas doses de 0,0375 mg de cloprostenol intramuscular, sete e quinze dias após a colheita de embriões.

2.6.3. Classificação e congelamento de embriões

O conteúdo uterino recuperado foi armazenado em placas de Petri e, em seguida, observado ao microscópio estereoscópico (Nikon, Japão) em um aumento de 20 X, a fim de se identificar e separar os embriões que foram, posteriormente, transferidos para o meio TQC Holding Plus (Nutricell[®], São Paulo, Brasil) a 37 °C e avaliados em relação estágio de desenvolvimento e qualidade (aumento de 50X).

Os embriões foram classificados em seis diferentes estádios de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS,1990). Quanto à qualidade, os embriões foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela IETS (1990), com adaptações. (Anexo 8

e 9). Todos os embriões classificados como viáveis (Grau I e II) foram congelados segundo a técnica descrita por Fonseca *et al.* (2005).

2.7. PROTOCOLOS ANESTESIOLOGICOS

Quinze minutos antes da laparoscopia pré-colheita, todos os animais receberam a seguinte medicação pré-anestésica (MPA): acepromazina, dose de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.v. (Acepran[®], Vetnil, São Paulo, Brasil), diazepam, dose de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.v. (Diazepam, Teuto[®], Goiás, Brasil) e morfina, dose de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.m. (Dolo Moff[®], São Paulo, Brasil).

Posteriormente, as ovelhas foram colocadas em maca própria e foi realizada a anestesia local na região de inserção dos trocartes, utilizando lidocaína 2% (dose máxima de 7 mg.kg^{-1}).

Após a laparoscopia, as ovelhas que responderam à superovulação foram submetidas à laparotomia para a colheita dos embriões. Para este procedimento, foi feita a tricotomia e antissepsia com solução de álcool 70°GL no membro anterior, na região da veia cefálica, para que esta fosse canulada utilizando um cateter 20G (BD[®], New Jersey, EUA). A via de acesso foi mantida com administração de solução Ringer Lactato (Ringer Lactato[®], JP, São Paulo, Brasil) na velocidade de $10 \text{ mL.kg}^{-1} \text{ hora}^{-1}$. Os animais foram induzidos com propofol, dose efeito, aplicando até no máximo 4 mg.kg^{-1} i.v. (Profolen[®], Balusiegel, São Paulo, Brasil) e diazepam ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) i.v.; tão logo perdessem os reflexos protetores laringeanos, procedia-se a intubação oro-traqueal com sonda compatível com o peso do animal e sua conexão a um circuito valvular com absorvedor de CO_2 .

A manutenção anestésica foi realizada por via inalatória com isoflurano (Forane[®], Abbott Laboratórios, Rio de Janeiro, Brasil) na concentração adequada para que não ocorressem respostas autonômicas, como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial. Os animais foram mantidos em ventilação controlada utilizando-se valores de frequência respiratória e volume corrente necessários para a manutenção de ETCO_2 entre 35 e 45 mmHg. A monitorização foi realizada com cardioscópio, monitor de pressão arterial não invasiva, oxímetro de pulso, termômetro digital, expirômetro, capnógrafo e analisador de gases expirados.

2.8. CONTROLE DA DOR E MEDICAÇÃO PÓS-CIRÚRGICA

Logo após a laparoscopia e a laparotomia os animais foram mantidos em ambiente tranquilo (baías coletivas), sem estresse, com água e alimentação *ad libitum*. Ao final destes procedimentos, os animais receberam durante três dias, a cada 24 horas, anti-inflamatório não-esteroidal (Maxicam[®] 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mg.kg⁻¹ via i.m. e antibiótico (Tetradur[®] LA-300, Merial, São Paulo, Brasil) na dose de 20 mg.kg⁻¹ via i.m., a cada 48 horas, totalizando 3 aplicações.

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS[™].

As variáveis intervalo da retirada da esponja de progesterona ao início do estro; intervalo da retirada da esponja de progesterona à primeira observação da ovulação; intervalo do início do estro à primeira observação da ovulação e duração do estro foram expressas em média e desvio padrão da média. Assim, foram submetidas à análise de variância usando o procedimento GLM e, posteriormente, comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

As variáveis média de tamanho entre os dois maiores folículos no início do tratamento superovulatório; número de corpos lúteos visualizados na ultrassonografia e na laparoscopia; número de estruturas totais coletadas; número de estruturas viáveis coletadas; número de estruturas degeneradas; número de estruturas não fecundadas; número de estruturas não viáveis e número de zonas pelúcidas também foram expressas em média e desvio padrão da média e avaliadas pela análise de variância por meio do procedimento GLM. As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

Para determinar a correlação entre o número de corpos lúteos visualizados na ultrassonografia e o número de corpos lúteos na laparoscopia utilizou-se a correlação de Pearson.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AVALIAÇÃO DA MANIFESTAÇÃO DO ESTRO E DO MOMENTO DE OVULAÇÃO NO PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO

Após o protocolo de superovulação, 100% (15/15) das ovelhas do grupo G_1 , 86,67% (13/15) das ovelhas do grupo G_2 e 92,86% (13/14) das ovelhas do grupo G_3 manifestaram estro. Todas as fêmeas dos grupos G_1 e G_3 manifestaram estro em até dois dias após a retirada da esponja. Já as ovelhas do grupo G_2 manifestaram estro em até 3 dias após, corroborando os achados de Cordeiro *et al.* (2003), os quais também observaram que todas as ovelhas submetidas à superovulação com FSHp manifestaram estro dentro de 3 dias após a retirada do implante de progesterona.

Devido a alta porcentagem de animais que apresentaram estro, verifica-se que o tratamento hormonal utilizado foi eficiente para induzir o estro nas ovelhas da raça Santa Inês.

Como pode ser observado na tabela 2, o intervalo da retirada da esponja ao início do estro (primeira aceitação da monta) diferiu ($P < 0,05$) entre os grupos G_1 e G_2 . Porém, este intervalo no grupo G_3 não diferiu ($P > 0,05$) em relação os grupos G_1 e G_2 . Apesar do intervalo para o estro do grupo G_3 não ter sido próximo ao observado no G_2 , a ausência de diferença entre os intervalos dos dois grupos, possivelmente, se deve à alta variação dos valores deste intervalo, principalmente entre as fêmeas do G_2 , evidenciada pelo alto desvio padrão e pela diferença entre os valores mínimo e máximo.

Ao utilizar o protocolo longo (tradicional) de sincronização antes do tratamento superovulatório, Torrès, Cognié, & Colas (1987) e Cordeiro *et al.* (2003) verificaram o início do estro $44,0 \pm 3,8$ e 36 horas, respectivamente, após a retirada do implante de progesterona, sendo mais tardio em relação ao resultado observado no grupo G_1 ($27,00 \pm 15,96$ horas), no qual também foi utilizado o protocolo longo.

Sabe-se que uso de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na fase luteal inicial (dias 3 e 4 após a ovulação), em protocolos de sincronização e indução da ovulação, podem encurtar o intervalo para o estro (RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA *et al.*, 2007; FREITAS & RUBIANES, 2008; MENCHACA & RUBIANES, 2012). Dessa forma, a antecipação

do estro nas ovelhas do grupo G_1 , em relação ao observado nas fêmeas dos estudos de Torrès, Cognié, & Colas (1987) e Cordeiro *et al.* (2003), pode estar associada ao uso de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao final do protocolo de superovulação para indução da luteólise, que não foi utilizada pelos autores anteriormente citados.

Considerando que o uso de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode influenciar no momento de início do estro, esperava-se que o início do estro ao final do protocolo de superovulação fosse semelhante entre os três grupos, visto que administrou-se $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos três tratamentos, no mesmo momento da administração da quinta dose de FSH.

Oliveira *et al.* (2012), ao utilizar o protocolo de sincronização longo, com substituição do implante de progesterona no dia 7 e associar $\text{PGF}_{2\alpha}$ e eCG ao final do tratamento de superovulação com FSH, observaram o início do estro $25,2 \pm 6,2$ horas após o fim do tratamento com progesterona. Este resultado foi semelhante ao observado nos grupos G_1 e G_3 . Com isso, sugere-se que a mesma raça pode responder de forma semelhante a diferentes protocolos.

Tabela 2. Avaliação dos intervalos (horas) da retirada da esponja ao início do estro (IRE); retirada da esponja à primeira observação da ovulação (IRPO); início do estro à primeira observação da ovulação (IIEPO) e da duração do estro (DE), no protocolo de superovulação (média $\pm$ desvio padrão)

	G₁			G₂			G₃		
	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.
IRE	27,00 $\pm$ 15,96 ^b (15)*	0,00	60,00	41,00 $\pm$ 17,09 ^a (13)	26,00	72,00	28,08 $\pm$ 9,11 ^{a,b} (13)	14,00	50,00
IRPO	64,86 $\pm$ 16,16 ^a (11)	34,58	96,68	75,86 $\pm$ 13,64 ^a (11)	52,00	92,83	60,86 $\pm$ 14,47 ^a (9)	40,58	88,17
IIEPO	37,05 $\pm$ 19,18 ^a (11)	11,17	61,42	38,89 $\pm$ 16,00 ^a (10)	2,83	62,58	35,86 $\pm$ 12,06 ^a (9)	21,58	59,17
DE	34,00 $\pm$ 19,85 ^a (12)	12,00	72,00	31,00 $\pm$ 9,94 ^a (6)	14,00	40,00	29,70 $\pm$ 10,04 ^a (10)	12,00	48,00

* os valores entre parênteses referem-se ao n

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05 – SNK)

Em relação à distribuição do momento de início do estro, após a retirada da esponja de progesterona, observou-se que as ovelhas do grupo G₁ tiveram o início do estro mais distribuído entre 12 e 60 horas; nas ovelhas do grupo G₂, o início do estro foi a partir de 36 horas e ficou distribuído entre 36 e 72 horas. Já as fêmeas do grupo G₃ tiveram o início do estro concentrado às 36 horas após a retirada da esponja de progesterona, ao final da superovulação (Figura 2). Esta diferença na distribuição do início do estro, após o tratamento superovulatório, do grupo G₁ em relação aos grupos G₂ e G₃, pode ser atribuída ao efeito dos protocolos de sincronização utilizados em cada grupo.

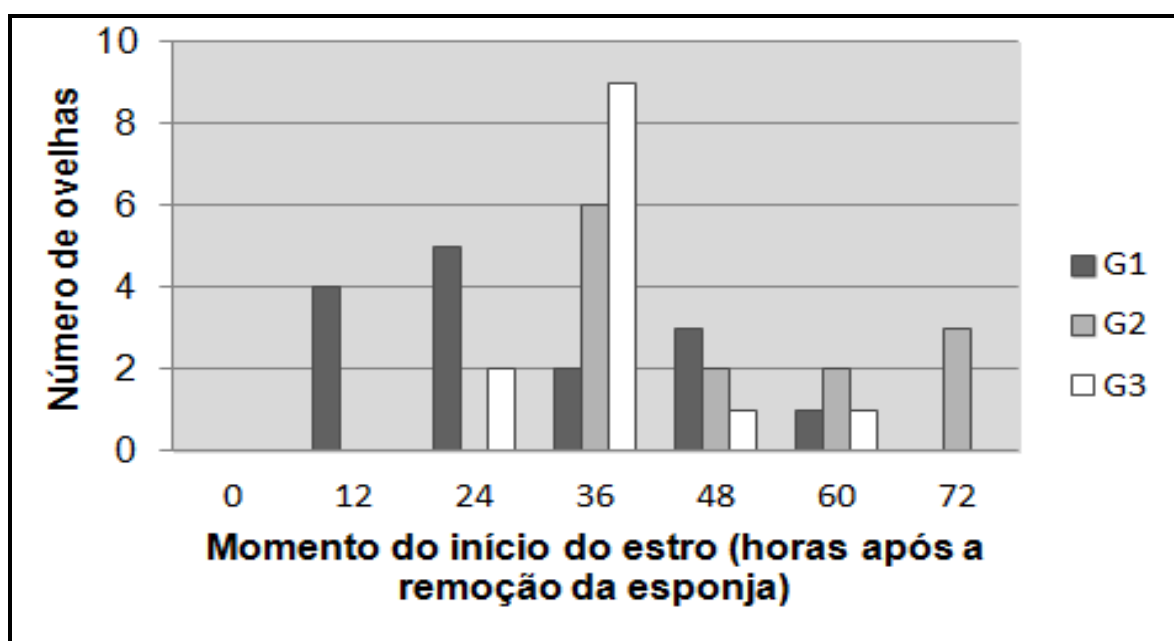


Figura 2. Histograma da distribuição das ovelhas em relação ao momento de início do estro após a retirada da esponja de progesterona (horas), ao final do protocolo de superovulação.

Foi constatado, em estudo prévio, que há maior dispersão do estro ao se utilizar protocolos de sincronização longos (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2008). Dessa forma, a maior dispersão do início do estro ao final da superovulação, no grupo G₁, pode ser atribuída ao uso do protocolo de sincronização longo.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na duração do estro (intervalo entre a primeira e a última aceitação da monta) entre os três grupos (Tabela 2), que foi semelhante ao descrito para o estro natural, com duração média de 30 horas (MORELLO & CHEMINEAU, 2008) e para o estro de fêmeas superovuladas com

FSHo ($29,5 \pm 3,95$ horas) ou com FSHo associado à eCG ($35,0 \pm 3,25$ horas) (NAQVI *et al.*, 2000).

O momento da ovulação foi determinado por meio de ultrassonografia transretal em tempo real, quando o maior folículo anteriormente identificado não estava mais presente. Foi possível determinar o momento da ovulação em 73,33% (11/15) das ovelhas do grupo G_1 e do grupo G_2 e em 64,29% (9/14) das ovelhas do grupo G_3 (Tabela 2). Não foi observada diferença ($P>0,05$) no intervalo da retirada da esponja de progesterona à primeira observação da ovulação, após o protocolo de superovulação, entre os três grupos experimentais (Tabela 2).

Determinou-se o intervalo do início do estro à primeira observação da ovulação em 73,33% (11/15) das ovelhas do grupo G_1 ; 66,66% (10/15) das ovelhas do grupo G_2 e 64,29% (9/14) das ovelhas do grupo G_3 , que também não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos (Tabela 2).

Fatores como a presença do macho, a cópula e o momento do pico de LH podem afetar o momento da ovulação (ROMANO, CHRISTIANS, & CRABO, 2000; DELGADILLO *et al.*, 2009; VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008). Segundo Lucidi, Barboni e Mattioli (2001) e Delgadillo *et al.* (2009), a presença constante do macho adianta o pico de LH, estimulando o desenvolvimento folicular e a ovulação, assim como a concentração das ovulações em um intervalo mais restrito.

Comparando os resultados do intervalo da retirada da esponja à ovulação nos três grupos com o estudo de Jabbour & Evans (1991), no qual as ovelhas também foram acasaladas por monta natural, observou-se que este intervalo foi menor (entre 48 e 55 horas) neste último. Além disso, o período de ovulação no estudo de Jabbour & Evans (1991) foi mais concentrado em relação ao estudo em questão.

Como, nos dois estudos, as ovelhas foram acasaladas por monta natural, houve “Efeito Cópula” (ROMANO, 1994; ROMANO, CHRISTIANS & CRABO, 2000). Dessa forma, a antecipação das ovulações das ovelhas do estudo de Jabbour & Evans (1991) em relação às ovelhas do presente estudo não pode ser explicada por este fenômeno. Com isso, sugere-se que não somente o grau de interação (ocorrência da cópula ou não) mas também o período de interação do macho com as fêmeas pode adiantar o momento da ovulação, visto que no manejo descrito por Jabbour & Evans (1991) as fêmeas permaneceram com os machos durante todo o dia, diferente do manejo do presente estudo no qual os machos permaneciam com as fêmeas somente durante a noite.

O momento da ovulação após o início do estro foi mais tardio em relação à ovulação no ciclo estral natural (24-27 horas) (FONSECA, *et al.*, 2011). Sabendo que no presente estudo as fêmeas foram acasaladas por monta natural, era esperado o adiantamento da ovulação (LUCIDI, BARBONI, & MATTIOLI, 2001; VARAGO *et al.*, 2009; PACHECO & QUIRINO, 2010). No entanto, sabe-se que o uso de hormônios utilizados nos protocolos de sincronização e superovulação pode induzir a alterações endócrinas que resultam na baixa secreção de LH endógeno ou na interferência sobre o momento do pico pré-ovulatório do mesmo (NOEL *et al.*, 1994; D'OCCHIO *et al.*, 1999; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a; VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008), adiando o momento da ovulação. Dessa forma, o adiamento da ovulação das ovelhas dos três grupos pode estar associado à este fenômeno.

3.2. DETERMINAÇÃO DE CORPOS LÚTEOS NA ULTRASSONOGRAFIA E NA LAPAROSCOPIA PRÉ-COLHEITA

Foi avaliada a acurácia da ultrassonografia na determinação do número de corpos lúteos (CL) antes da colheita de embriões, em relação à avaliação do número de CL por laparoscopia, para estimar a resposta superovulatória das fêmeas (Figura 3). Não foi possível visualizar os ovários na ultrassonografia ou na laparoscopia em 23 das 45 repetições realizadas neste estudo, inviabilizando a avaliação de correlação nessas situações.

Observou-se correlação significativa ($r = 1,00$; coeficiente de correlação de Pearson, $P < 0,0001$) entre o número de CLs observados por meio da ultrassonografia pré-colheita (CLUS) e da laparoscopia pré-colheita (CLLP). Dessa forma, a partir deste resultado, sugere-se que a ultrassonografia pode ser uma alternativa não invasiva para a determinação da resposta das fêmeas ao protocolo de superovulação, concordando com o estudo de Dickie *et al.* (1999) que considerou a ultrassonografia ovariana transretal uma alternativa à laparoscopia para a contagem de CL em ovelhas.

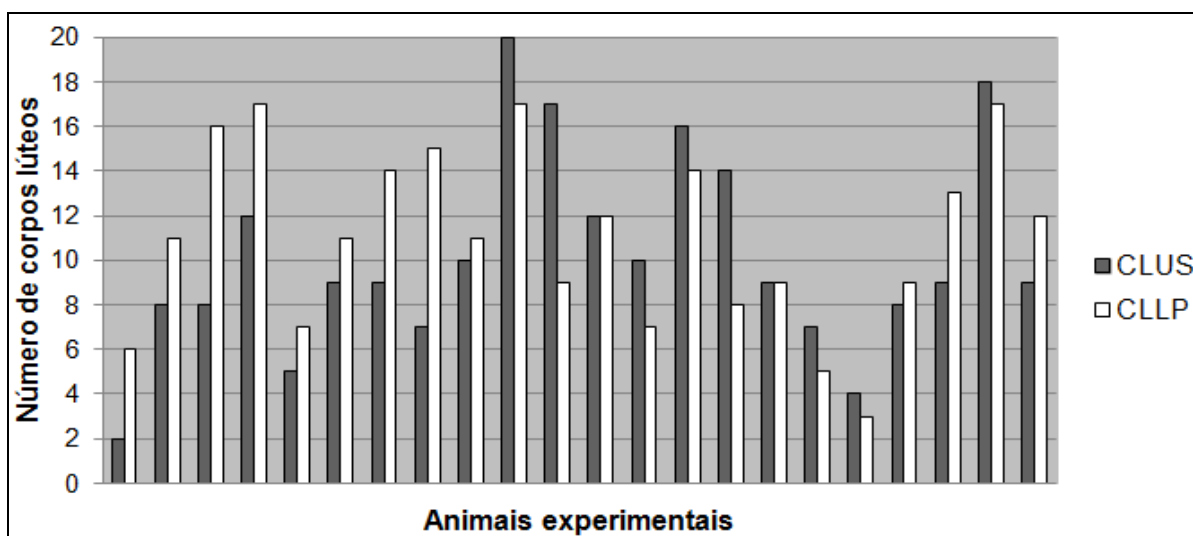


Figura 3. Histograma do número de corpos lúteos visualizados na ultrassonografia (CLUS) realizada no dia anterior ao da colheita de embriões e na laparoscopia (CLLP), logo antes da colheita de embriões, em função dos animais experimentais.

Portanto, como a laparoscopia é uma técnica semi-cirúrgica e a recuperação de embriões nas ovelhas é feita, principalmente, por via cirúrgica, a implementação de técnicas não invasivas, como a ultrassonografia, pode evitar cirurgias desnecessárias em animais que não responderam ao tratamento superovulatório, reduzindo, assim, a perda precoce de doadoras devido à ocorrência de aderências causadas pelos procedimentos cirúrgicos.

3.3. RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

A resposta superovulatória das ovelhas, avaliada pela contagem de corpos lúteos (CL) por laparoscopia no dia da colheita de embriões, foi de 60% (9/15) das fêmeas no grupo G1, 40% (6/15) das fêmeas no grupo G2 e 57,14% (8/14) das fêmeas no grupo G3, apresentando número de CL superior a 4 e submetidas à colheita de embriões (Tabela 3).

Esta resposta, nos três grupos experimentais, foi inferior à de estudos que também trabalharam com ovelhas da raça Santa Inês sincronizadas com protocolo tradicional e superovuladas com FSHp. Cordeiro *et al.* (2003), Gusmão *et al.* (2007), Varago *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2012) observaram que 66% (com 3 ou mais corpos lúteos), 74% (com mais de 2 corpos lúteos) 71,42% (com mais de 5 corpos

lúteos) e 100% (com mais 4 corpos lúteos) das fêmeas responderam ao protocolo de superovulação, respectivamente.

Com isso, verifica-se que a resposta superovulatória das ovelhas dos grupos G₁, G₂ e G₃ não foi satisfatória, quando comparada com as respostas descritas pela literatura.

A substituição de implantes antes do início do tratamento com FSH pode produzir melhoras nas respostas ao tratamento superovulatório (THOMPSON *et al.*, 1990). Portanto, o maior número de fêmeas que responderam à superovulação nos estudos de Gusmão *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2012), em relação ao obtido no grupo G₁, possivelmente, se deve ao fato dos implantes de progesterona terem sido substituídos nestes estudos.

Tabela 3. Resposta das ovelhas da raça Santa Inês ao tratamento superovulatório em relação à porcentagem de fêmeas que apresentaram mais de quatro corpos lúteos e ao número de estruturas recuperadas nos três grupos experimentais (média $\pm$ desvio padrão)

	G ₁			G ₂			G ₃		
	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.
Ovelhas que responderam ao tratamento superovulatório (%)	60,00% (9/15)	-	-	40,00% (6/15)	-	-	57.14% (8/14)	-	-
Estruturas totais	8,44 $\pm$ 4,39 (9)	2,00	17,00	9,50 $\pm$ 6,35 (6)	4,00	22,00	11,75 $\pm$ 10,29 (8)	2,00	34,00
Estruturas viáveis	6,00 $\pm$ 4,72 (9)	0,00	15,00	3,83 $\pm$ 6,40 (6)	0,00	16,00	7,50 $\pm$ 6,52 (8)	1,00	20,00
Estruturas degeneradas	0,44 $\pm$ 0,72 (9)	0,00	2,00	0,16 $\pm$ 0,41 (6)	0,00	1,00	0,25 $\pm$ 0,70 (8)	0,00	2,00
Estruturas não fertilizadas	1,89 $\pm$ 3,17 (9)	0,00	10,00	4,00 $\pm$ 3,22 (6)	0,00	8,00	3,87 $\pm$ 6,08 (8)	0,00	15,00
Zona pelúcida	0,11 $\pm$ 0,33 (9)	0,00	1,00	1,50 $\pm$ 1,87 (6)	0,00	5,00	0,12 $\pm$ 0,35 (8)	0,00	1,00
Estruturas não viáveis	2,33 $\pm$ 3,12 (9)	0,00	10,00	4,17 $\pm$ 3,43 (6)	0,00	8,00	4,12 $\pm$ 6,49 (8)	0,00	15,00

* os valores entre parênteses referem-se ao n (P>0,05 – SNK)

Ao comparar a resposta superovulatória entre cabras submetidas ao protocolo do dia 0 e ao protocolo tradicional, Menchaca *et al.* (2007) observaram que 85% e 50% das fêmeas do primeiro e segundo tratamentos, respectivamente, responderam; diferente do que foi observado no presente estudo, no qual uma maior porcentagem (64,29%) de ovelhas que responderam foi observada no grupo submetido ao protocolo tradicional (G₁).

Segundo Brebion *et al.* (1992), em um programa de MOTE cerca de 20% das fêmeas ovinas ou caprinas não respondem à superovulação. No presente estudo, a porcentagem de ovelhas com menos de 4 corpos lúteos, ou seja, que não responderam ao tratamento, foi maior do que 20% nos três grupos, sendo que o grupo G₁ apresentou a menor porcentagem (40%), evidenciando a alta variabilidade das respostas ao tratamento superovulatório, como descrito por Cognié (1999). Dentre os diversos fatores, sabe-se que as diferentes preparações de gonadotrofinas e a associação de FSH com eCG ou GnRH podem contribuir para a variabilidade das resposta superovulatórias (NAQVI *et al.*, 2000).

A ocorrência de falhas na resposta ao tratamento superovulatório também foi descrita por diversos estudiosos, sendo considerada como um dos grandes entraves para a obtenção de resultados satisfatórios de produção de embriões em programas de MOTE (COGNIE, 1999; NAQVI *et al.*, 2001; COGNIE *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a).

Não foi observada diferença ($P>0,05$) em relação à resposta ovulatória dos grupos G₁, G₂ e G₃, determinada pelo número de corpos lúteos visualizados na laparoscopia. Verifica-se que houve uma grande variação entre as fêmeas do mesmo grupo em relação a resposta ovulatória, evidenciada pelo alto valor do desvio padrão das médias (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação ovariana em relação à presença de corpos lúteos, por meio de ultrassonografia transretal e por laparoscopia (média $\pm$ desvio padrão)

		Ultrassom pré-colheita	Laparoscopia pré-colheita
G₁	Média	6,92 $\pm$ 5,93 (14)	9,72 $\pm$ 5,25 (11)
G₂	Média	9,07 $\pm$ 6,03 (13)	6,14 $\pm$ 5,76 (14)
G₃	Média	7,61 $\pm$ 3,23 (13)	8,45 $\pm$ 5,31 (11)
Total		7,85 $\pm$ 5,19 (40)	7,94 $\pm$ 5,53 (36)

* os valores entre parênteses referem-se ao n. ($P > 0,05$ - SNK)

O resultado observado no grupo G₁ foi próximo à resposta ovariana observada por Cordeiro *et al.*, (2003) em ovelhas da raça Santa Inês (10,6 $\pm$ 1,0 CL) e por Menchaca *et al.* (2009) em ovelhas da raça Merino (10,1 $\pm$ 1,1 CL), os quais também utilizaram o protocolo tradicional.

Considerando a resposta superovulatória das ovelhas submetidas ao protocolo do dia 0 (13,5 $\pm$ 1,4 CL) no estudo de Menchaca *et al.* (2009), as fêmeas dos grupos G₂ e G₃ apresentaram uma resposta mais baixa. Segundo Menchaca *et al.* (2009), o uso de GnRH ao final do tratamento de superovulação está associado à uma melhor resposta ovulatória. Portanto, sugere-se que a menor resposta dos grupos G₂ e G₃, em relação ao observado no estudo de Menchaca *et al.* (2009), pode ser atribuída ao fato de não ter sido utilizado GnRH ao final do tratamento com FSH no presente estudo.

Observou-se que a resposta ovariana não foi afetada pela duração do tratamento com progesterona, assim como foi verificado por Menchaca *et al.* (2009), ao comparar as repostas entre ovelhas tratadas com protocolo longo (14 dias) e curto (5-7 dias). Sendo assim, sugere-se que o protocolo curto de sincronização pode ser utilizado como uma alternativa ao uso de protocolos longos, simplificando os programas de MOTE.

Com base nos resultados do presente estudo e da literatura, descritos acima, verifica-se a ocorrência de variações nas respostas superovulatórias, independentemente do protocolo utilizado e sabe-se que vários fatores ligados ao animal (raça, idade, variação individual) e extrínsecos (protocolo hormonal, a fonte de progesterona e o perfil induzido pelos dispositivos e a fonte da gonadotrofina utilizados no tratamento) podem contribuir para estas variações (NAQVI *et al.*, 2000 ;

GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a; OLIVEIRA, 2011).

Observou-se a ocorrência de folículos grandes no início do tratamento superovulatório em alguns animais. Dos trinta e oito animais nos quais foi possível observar a condição folicular neste momento, por meio da ultrassonografia transretal, 19 (50%) apresentaram folículos com tamanho acima de 4 mm, sendo 26,5% (5/19) do grupo G₁, 57,89% (11/19) do grupo G₂ e 10,53% (2/19) do grupo G₃.

Com base nestes dados, sugere-se que o protocolo do grupo G₃ foi o mais eficiente em promover a sincronização da onda folicular, concordando com os achados de Menchaca *et al.* (2007) em estudo realizado com cabras, que constataram que o protocolo do dia 0 promoveu uma melhor resposta de sincronização da onda. Estes autores verificaram a ausência de folículos grandes, no início do tratamento com FSH, em 84,1% das fêmeas tratadas com o protocolo curto e em 13% das fêmeas submetidas ao protocolo tradicional.

Em relação ao grupo G₁, três ovelhas que apresentaram o maior folículo com diâmetro acima de 4 mm no início do tratamento com FSH tiveram uma resposta superovulatória alta (15, 11 e 17 CL), sendo que duas tiveram uma alta taxa de embriões viáveis recuperados e na terceira, as duas estruturas recuperadas eram não fertilizadas. As outras duas fêmeas que também apresentaram folículos grandes não responderam ao protocolo de superovulação.

Cinco das onze ovelhas do grupo G₂ que apresentaram folículos maiores do que 4 mm, no início do tratamento de superovulação, tiveram resposta entre 7 e 17 CL. Porém, apesar da boa resposta superovulatória destas fêmeas, quatro delas tiveram um número de estruturas recuperadas abaixo do número de CL ou alto número de estruturas não fertilizadas. Em relação às outras seis fêmeas, cinco não responderam à superovulação e somente uma apresentou uma taxa de ovulação satisfatória e um alto número de embriões viáveis.

Uma ovelha, das duas do grupo G₃ que apresentaram folículos grandes, respondeu ao tratamento superovulatório. Porém, o número de estruturas recuperadas foi menor do que o número de CL observados. A outra ovelha não respondeu à superovulação.

Sabe-se que a variabilidade da resposta superovulatória entre as fêmeas também é afetada pela condição folicular no início do tratamento superovulatório, já que a assincronia entre o início do tratamento com gonadotrofina e o status folicular

pode causar variação na resposta folicular (RUBIANES *et al.*, 1995; RUBIANES *et al.*, 1997; VARAGO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Segundo González-Bulnes *et al.* (2002b), a resposta ovariana (número de corpos lúteos) e a recuperação de embriões foi positivamente correlacionada com o número de pequenos folículos antrais no início do tratamento superovulatório.

Em ovelhas, quando o tratamento superovulatório foi iniciado na presença de um folículo grande, observou-se uma baixa população de folículos pequenos, resultando em um baixo recrutamento folicular e, conseqüentemente, reduzido número de ovulações (RUBIANES *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002a; MENCHACA *et al.*, 2009). Este fenômeno, possivelmente, explica os achados do presente estudo, no qual o grupo experimental com menor porcentagem de ovelhas que responderam ao protocolo de superovulação (40%) foi o G₂, sendo observado neste grupo um maior número de fêmeas com folículos grandes no dia da administração da primeira dose de FSH.

Em estudos prévios, observou-se que em protocolos de sincronização longos utilizando progesterona ocorre uma redução da concentração deste hormônio, a qual atinge valores subluteais, induzindo à alterações endócrinas que causam a persistência do folículo dominante (VIÑOLES *et al.*, 1999; RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA *et al.*, 2009). Portanto, este fenômeno pode explicar a presença de folículos dominantes em algumas fêmeas do grupo G₁, após o término do tratamento com progesterona, logo antes do início da superovulação.

O grupo G₂ apresentou uma maior porcentagem de ovelhas com folículos grandes em relação ao grupo G₃. O uso de GnRH após a retirada do implante de progesterona, na sincronização do estro, evita a persistência de folículos dominantes e aumenta o número de fêmeas responsivas ao protocolo de superovulação (BALDASSARE, 2008; MENCHACA *et al.*, 2010). Com isso, a menor porcentagem de ovelhas com folículos anovulatórios no início do tratamento com FSH no grupo G₃, em relação ao grupo G₂, possivelmente, se deve à associação de GnRH ao protocolo de sincronização aplicado nas ovelhas deste primeiro grupo (G₃).

Porém, como descrito anteriormente, mesmo tendo apresentado folículos anovulatórios, algumas ovelhas tiveram alta taxa de ovulação e de recuperação de estruturas viáveis. Evans *et al.* (2000) e Bartlewski, Baby & Giffin (2011) descreveram que em ovelhas com múltiplas ovulações pode ocorrer codominância folicular, o que pode explicar a resposta superovulatória satisfatória das fêmeas do

presente estudo que apresentaram folículos maiores do que 4 mm, no início do tratamento com FSH.

Outro fator que pode explicar a ausência do efeito de bloqueio dos folículos anovulatórios sobre o crescimento e ovulação de múltiplos oócitos é a possibilidade de estes folículos estarem em fase de atresia. Apesar da presença física dos folículos anovulatórios, quando se encontram em atresia eles ficam apenas morfológicamente dominantes e não exercem a dominância funcional, o que não impede o desenvolvimento de outros folículos em resposta ao tratamento com FSH (VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008), como ocorreu nestas ovelhas do presente estudo.

Dentre os fatores que podem estar associados à recuperação de estruturas não fertilizadas, sabe-se que a permanência das esponjas de progesterona por período prolongado pode provocar alterações na fisiologia cervical e uterina pela maior impregnação de progestágenos, comprometendo, assim, o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides, o que reduz a taxa de fertilidade (QUINLIVAN & ROBINSON, 1969; URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID, & OSORIO, 2009; FONSECA *et al.*, 2011). Além disso, o uso de protocolos longos com progesterona pode induzir a um crescimento exagerado dos folículos, gerando oócitos envelhecidos e menos férteis (VIÑALES *et al.*, 2001, FREITAS & RUBIANES, 2008). Isto pode explicar a ocorrência de recuperação de estruturas não fertilizadas em fêmeas do grupo G₁ com boa resposta ovulatória, já que estas foram tratadas com o protocolo tradicional.

Em um estudo recente, observou-se que folículos anovulatórios podem produzir altas quantidades de estradiol e que este fenômeno, no início do tratamento com FSH, pode afetar a resposta final da superovulação, pois interfere no processo de fertilização e desenvolvimento embrionário, evidenciando o efeito negativo da ocorrência de dominância folicular no início do tratamento superovulatório (VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2006). Portanto, falhas na fertilização em ovelhas superovuladas também podem estar associadas com a alta produção de estradiol pelos folículos anovulatórios.

Estudos anteriores verificaram que altas concentrações de estradiol mantidas por um período prolongado, próximo ao estro e à ovulação, podem provocar um desenvolvimento anormal dos oócitos e comprometer o transporte destes e dos gametas masculinos ao longo do trato reprodutivo feminino, afetando as taxas de fertilização (JABBOUR & EVANS, 1991; COGNIÉ, 1999).

Dessa forma, a recuperação de uma quantidade menor de estruturas que o número de corpos lúteos visualizados ou de um alto número de estruturas não fertilizadas nas ovelhas dos grupos G_1 e G_2 com boa resposta superovulatória e que apresentaram folículos anovulatórios, possivelmente, está associada à este fenômeno. Estes resultados corroboram o estudo de González-Bulnes *et al.* (2002b), no qual observou-se que a presença do folículo anovulatório não afetou a taxa de ovulação, mas obteve-se um baixo número de embriões viáveis, havendo, portanto, efeito negativo da presença de folículos anovulatórios sobre a recuperação de embriões.

Observando a tabela 5, verifica-se que a presença de folículos com diâmetro acima de 4mm no início do tratamento superovulatório afetou a qualidade de recuperação das estruturas nas ovelhas que responderam ao tratamento, concordando com o que foi observado no estudo de González-Bulnes, *et al.* (2002b) pois, no presente estudo, obteve-se um alto número de embriões degenerados e estruturas não fertilizadas no grupo de fêmeas que apresentaram estes folículos anovulatórios.

Tabela 5. Qualidade das estruturas recuperadas das ovelhas que apresentaram folículos menores ou iguais a 4mm, assim como das ovelhas que apresentaram folículos maiores que 4mm no início da superovulação

	FOLÍCULOS $\leq$ 4mm	FOLÍCULOS $>$ 4mm
Número de ovelhas	9	12
Estruturas totais	78	67
Embriões viáveis	58	7
Embriões degenerados	4	35
Estruturas não fertilizadas	16	25

Nas ovelhas que apresentaram folículos anovulatórios e não responderam ao tratamento superovulatório ou produziram baixo número de embriões viáveis, o objetivo final do tratamento superovulatório foi afetado pela ocorrência de dominância folicular, concordando com o estudo de González-Bulnes, *et al.* (2004b), no qual verificou-se que a presença do folículo dominante no início do tratamento com FSH afetou a produção de embriões em ovelhas.

O grupo G_3 apresentou a menor porcentagem de ovelhas com folículos anovulatórios e sabe-se que o uso da sincronização da onda folicular por meio de

dispositivos de progesterona mantidos por um curto período (5-6 dias), antes do início do tratamento superovulatório, induz à inibição das gonadotrofinas hipofisárias, por meio do aumento da concentração de progesterona à níveis supraluteais. Este fenômeno leva à regressão dos folículos grandes e à indução da emergência de uma nova onda folicular, a partir da qual há o crescimento de novos folículos saudáveis (MENCHACA *et al.*, 2007; MENCHACA *et al.*, 2009). Dessa forma, sugere-se que o uso do protocolo do dia 0, associado à aplicação de GnRH ao final da sincronização, favoreceu a menor persistência de folículos grandes neste grupo.

Portanto, o uso destes protocolos de sincronização são uma ferramenta importante para o melhor controle da dinâmica folicular, reduzindo o efeito negativo de folículos grandes sobre a resposta superovulatória e sobre a produção de embriões, ao permitir que o tratamento com FSH se inicie junto com a emergência da onda folicular (RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA *et al.*, 2007; MENCHACA *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados observados, nota-se que ainda existe uma variação em relação ao efeito da presença dos folículos dominantes sobre a resposta superovulatória, evidenciando que a dominância folicular, assim como seus efeitos sobre as resposta ovulatórias em programas de superovulação, ainda não estão totalmente esclarecidos. Além disso, outros fatores já mencionados, como a quantidade de folículos em crescimento no ovário antes do tratamento de superovulação e a variação individual das respostas aos protocolos, como descrito por Armstrong & Evans (1983) e González-Bulnes *et al.* (2002b), podem ter influenciado nas respostas das fêmeas deste estudo.

Na Tabela 3, podem ser observados os dados das estruturas recuperadas nos três grupos experimentais (G_1 , G_2 e G_3) de acordo com a qualidade das mesmas.

Considerando os resultados do presente estudo, foi possível verificar que 60% (G_1), 66,66% (G_2) e 28,57% (G_3) do total de ovelhas em cada grupo não responderam ao protocolo de superovulação, tiveram recuperados somente estruturas degeneradas ou não fertilizadas ou apresentaram regressão precoce de corpo lúteo. Este resultado está acima da média descrita por Baldassare (2008), o qual observou que, em programas de superovulação, entre 20-30% das fêmeas não respondem ao tratamento com FSH, apresentam somente estruturas degeneradas/não fertilizadas ou regressão precoce de corpo lúteo.

Os valores de estruturas totais recuperadas não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos G_1 , G_2 e G_3 (Tabela 3).

Como pode ser observado pelos valores mínimo e máximo de estruturas recuperadas e pelo alto desvio padrão das médias (Tabela 3), houve uma grande variação em relação à recuperação de estruturas entre as fêmeas do mesmo grupo. Segundo Cognié *et al.* (2003) e González-Bulnes *et al.* (2004a), esta variação na produção de embriões, assim como a variabilidade da resposta ovariana ao tratamento superovulatório, são um dos fatores mais limitantes para o sucesso dos programas de MOTE.

A recuperação de estruturas viáveis também não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos G_1 , G_2 e G_3 , assim como as médias de estruturas não viáveis, degeneradas e não fertilizadas (Tabela 3).

Tem sido relatado em programas de superovulação uma média de recuperação de estruturas transferíveis que varia de 2 a 6 em fêmeas (ovelhas ou cabras) submetidas ao protocolo tradicional e de 5 a 8 em fêmeas tratadas com o protocolo do dia 0 (RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA *et al.*, 2007; MENCHACA *et al.*, 2009), sendo que a média do grupo G_1 ($6,00 \pm 4,72$) foi semelhante à descrita por estes autores, em fêmeas tratadas com o protocolo tradicional. A média de estruturas viáveis recuperadas foi menor no grupo G_2 ($3,83 \pm 6,40$) e no grupo G_3 foi semelhante ($7,50 \pm 6,52$) à média descrita acima para fêmeas tratadas com o protocolo do dia 0. Porém, é importante considerar que, segundo Baldassare (2008), devido à grande variabilidade dos resultados de recuperação de estruturas (de 0-30 embriões por doadora), o desvio-padrão é alto, como ocorreu no presente estudo e, assim, estes valores devem ser aceitos com critério.

Azawi & Al-Mola (2010) utilizaram o protocolo tradicional, associado ao acasalamento por monta natural, em ovelhas da raça indiana Awassi e obtiveram uma recuperação de embriões de $4,83 \pm 0,6$, sendo um pouco menor em relação ao observado nas ovelhas do grupo G_1 ($6,00 \pm 4,72$).

Fatores como a raça, a idade, o manejo nutricional e as condições climáticas, o tipo de progesterona, o protocolo de administração da gonadotrofina utilizada e sua origem e pureza, assim como a condição folicular no início do tratamento superovulatório, podem influenciar nas respostas e na variabilidade das mesmas

(RUBIANES *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002b; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2004a; OLIVEIRA, 2011)

Sendo assim, a diferença entre os resultados de recuperação de embriões descritos por Azawi & Al-Mola (2010) e os observados no grupo G₁, pode ter sido devido à variação das respostas de acordo com a raça, o tipo de progesterona utilizada ou a origem e pureza da gonadotrofina administrada, como descrito anteriormente.

Já em outro estudo realizado por Simonetti *et al.* (2008), com ovelhas da raça Corriedale tratadas com o protocolo de sincronização tradicional, superovuladas com 8 doses decrescentes de FSH e acasaladas por monta natural, verificou-se uma recuperação de estruturas totais ($7,8 \pm 0,8$) e de embriões viáveis ($5,5 \pm 0,8$) semelhante à das ovelhas do grupo G₁ ($8,44 \pm 4,39$ e $6,00 \pm 4,72$, respectivamente).

Portanto, com base nos valores de estruturas totais e viáveis observados pelo estudo anterior, verifica-se que as ovelhas do grupo G₁ apresentaram uma resposta satisfatória ao protocolo longo.

Ao comparar os protocolos longo e curto, Menchaca *et al.* (2009) constataram que a duração do tratamento de sincronização com progesterona não afetou a resposta ao tratamento superovulatório em relação à qualidade das estruturas recuperadas, concordando com os resultados do presente estudo.

Porém, segundo os mesmos autores, o início do tratamento com FSH, utilizando o protocolo do dia 0 (tradicional), na emergência da primeira onda folicular, melhorou os resultados dos programas de MOTE em ovelhas, pois obteve-se uma maior taxa de ovulação ($13,5 \pm 1,4$ corpos lúteos) e um maior número de embriões transferíveis ($7,9 \pm 1,4$ embriões), em relação ao protocolo tradicional ($10,1 \pm 1,1$ e $5,9 \pm 1,1$, respectivamente). Menchaca *et al.* (2007), ao realizar um estudo com cabras, constataram que o uso do protocolo do dia 0 aumentou a porcentagem de fêmeas responsivas ao tratamento de superovulação, as quais apresentaram melhor taxa de ovulação e de produção de embriões em relação às fêmeas tratadas com o protocolo tradicional. Estes estudos diferem do que foi observado, já que não houve diferença na resposta superovulatória e na produção de embriões entre os três grupos (G₁, G₂ e G₃).

Portanto, de acordo com os resultados observados no presente estudo, sugere-se que o uso do protocolo do dia 0, ou seja, com menor duração do tratamento com progesterona, pode ser aplicado nos programas de MOTE sem

afetar as respostas superovulatórias, apresentando, ainda, uma implicação prática de simplificação dos programas reprodutivos.

Apesar de não ter havido diferença em relação à recuperação de estruturas viáveis entre os três grupos, em algumas ovelhas que tiveram a reposta superovulatória de moderada (9-16 CL) a alta (> 16 CL), conforme classificação de Armstrong & Evans (1983), a recuperação de estruturas foi baixa ou obteve-se um alto número de estruturas não fertilizadas, o que explica a correlação baixa porém positiva entre o número de CL e o número de estruturas totais recuperadas ($r = 0,40$ - $P < 0,05$) e baixa e não significativa entre o número de CL e o número de estruturas viáveis recuperadas ($r = 0,31$ - $P > 0,05$). Este fenômeno foi observado em 10 ovelhas das 23 coletadas (43,48%), sendo 3 do grupo G_1 ; 4 do grupo G_2 e 3 do grupo G_3 .

A recuperação de um alto número de estruturas não fertilizadas nestas ovelhas com mais de 9 ovulações, pode ter sido consequência da não captação dos oócitos pelas fímbrias e perda destes na cavidade peritoneal devido à alta taxa de ovulação, como descrito por Naqvi *et al.* (2001). Este resultado concorda com o que foi descrito em estudos anteriores, os quais verificaram que, independente do tratamento superovulatório utilizado, é comum a ocorrência de baixas taxas de fertilização após o acasalamento por monta natural, especialmente em fêmeas que ultrapassam 10 ovulações (LOI *et al.*, 1998).

Sabe-se que no acasalamento por monta natural o transporte dos espermatozoides até o local de fecundação pode ficar comprometido, devido à falha dos mesmos em atravessar a cérvix em número suficiente para produzir altas taxas de fertilização (TROUSON & MOORE, 1974; HAWK, COOPER, & CONLEY, 1987). Além disso, a dificuldade dos espermatozoides em ultrapassar a barreira cervical pode ser agravada pelos tratamentos hormonais de sincronização e superovulação, pois já foi demonstrado que estes tratamentos interferem no transporte dos espermatozoides em ovelhas acasaladas por monta natural (NAQVI *et al.*, 2001; BARI *et al.*, 2003). Desta forma, este outro fenômeno também pode ter ocorrido nestas ovelhas que apresentaram alto número de estruturas não fertilizadas.

4. CONCLUSÕES

A resposta superovulatória e a qualidade das estruturas recuperadas, em ovelhas da raça Santa Inês, não foram afetadas pelo tipo de protocolo de sincronização utilizado.

O uso do protocolo curto de sincronização, associado à aplicação de GnRH 12 horas após a retirada da esponja de sincronização, evita a persistência de folículos dominantes, aumentando o número de ovelhas responsivas ao protocolo de superovulação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANALYSIS SYSTEM FOR WINDOWS SAS™. SAS INSTITUTE INC., CARY, NC, USA, 2002.

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G.. Embryo Transfer in Sheep and Goats. *Theriogenology*, v.19 n.1, p.31–42, 1983.

AZAWI, O. I.; AL-MOLA, M. K. M. A.. A study on superovulation using FSH and eCG in Awassi ewes. *Tropical animal health and production*, v.42, n.5, p.799–801, 2010.

BALDASSARE, H. Coleta e transferência de embrião. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.11, p.143-152.

BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERRELL, B.. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, v.59, n.5-6, p.1265–1275, 2003.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L.. Reproductive cycles in sheep. *Animal reproduction science*, v.124, n.3-4, p.259–68, 2011.

BREBION P.; BARIL G.; COGNIÉ Y.; VALLET J. C. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Annales de Zootechnie*, v.41, p.331-339,1992.

COGNIÉ, Y. State of the Art in Sheep-Goat Embryo Transfer *Theriogenology*. *Theriogenology*, v.51, p.105–116, 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59. n.1, p.171–188, 2003.

CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, J. B.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FARIAS, L. N.; SALLES, H. O.; SIMPLÍCIO, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research*, v. 49,n.1, p,19–23, 2003.

DELGADILLO, J. A.; GELEZ, H.; UNGERFELD, R.; HAWKEN, P. A. R.; MARTIN, G. B. The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behavioural Brain Research*, v.200, n.2, p.304–314, 2009.

DICKIE, A. M.; PATERSON, C.; ANDERSON, J. L. M.; BOYD, J. S. Determination of corpora lutea numbers in Booroola-Texe ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, v.51, p.1209–1224, 1999.

D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B. R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology*, v. 51, p.9–35, 1999 .

EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M. P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, v.53, p.699–715, 2000.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *Anais Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, v.16, p.1–9, 2005.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; ZAMBRINI, F. N.; PALHÃO, M. P.; SANTOS, A. F. A. Freezing goat embryos using ethylene glycol and a slow cooling rate. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS, 9th., 2005, Murcia. Proceedings ... Murcia: ESDAR, 2005 410p. p.350 (Abstract P27).

FONSECA, J. F.; CRUZ, R. C.; PINTO, P. H. N.; FACÓ, O. Manual de indução e sincronização de estro e ovulação em ovinos e caprinos. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2011. 59p. Disponível em : <<http://www.cnpc.embrapa.br/documentos>>. Acesso em: 23 maio, 2012.

FREITAS, V. J. F.; RUBIANES, E. Preparação das fêmeas: detecção e controle do estro e da ovulação. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.7, p.89-100.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J.. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v.58, n.8, p.1607–1614, 2002a.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J. H.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D.T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*, v.57, n.4, p.1263–72, 2002b.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J. A.; DÍAZ-DELFA, C.; GARCIA-GARCIA, R. M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant Research*, v.48, n.1, p.9–14, 2003.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; COCERO, M. J.; GARCÍA-GARCÍA, R. M.; INSKEEP, E.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; MCNEILLY, A.S.; SANTIAGO-MORENO, J.; SOUZA, C.J.H.; VEIGA-LÓPEZ, A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, fertility, and development*, v.16, n.4, p.421–35, 2004a.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Animal reproduction science*, v.84, n.1-2, p.107–19, 2004b.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; BITTENCOURT,

T.C.B.S.C; BARBOSA, L.P. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no semi-árido. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, p.1–10, 2007.

HAWK, H. W.; COOPER, B. S.; CONLEY, H. H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology*, v.28, n.2, p.139–153, 1987.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. Manual of the International Embryo Transfer Society. Eds. Stringfellow DA, Seidel SM. 2^a ed. USA, Champaign. 1990, p.79.

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. *Animal Reproduction Science*, v.26, n.1-2, p.93–106; 1991.

LOI, P.; PTAK, G.; DATTENA, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; CAPPAL, P. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. *Reproduction, Nutrition and Development*, v.38, p.615-628, 1998.

LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination. *Theriogenology*, v.55, n.01, p.1797–1805, 2001.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, v.68, n.8, p.1111–1117, 2007.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v.72, n.4, p.477–483, 2009.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, fertility, and development*, v.22, n.1, p.113–118, 2010.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. *Avances en el control ovárico en la oveja*. In: REUNIÓN BIANUAL SOBRE REPRODUCCIÓN ANIMAL. 2012, México. *Compêndio...* México:Universidad Autónoma del Estado de México, 2012. 166p. p.76–83

MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatômicas e funcionais do sistema reprodutor da fêmea. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.2, p.11-25.

NAQVI, S. M. K.; GULYANI, R.; PAREEK, S. R. Effect of superovulatory regimens on ovarian response and embryo production in fine wool sheep in tropics. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v.13, n.5, p.595–599, 2000.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Research*, v.39, n.3, p.199–208, 2001.

NOEL, B.; BISTER, J. L.; PIERQUIN, B.; PAQUAY, R. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology*, v.41, p.719–27, 1994.

OLIVEIRA, M. E. F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, Suppl. 1, p.29–35, 2011.

OLIVEIRA, M. E. F.; CORDEIRO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SOUZA, S. F.; PIERONI, J. S. P.; RODRIGUES, L. F. S.; FONSECA, J. F. F.; VICENTE, W.R.R. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? *Ciência Rural*, v.42, n.6, p.1077–1082, 2012.

OLIVEIRA, R. P. M.; OLIVEIRA, F. F. Manipulação do ciclo estral em ovinos. *PUBVET-Publicações em Medicina Veterinária*, v.2, n.7, p.1–29, 2008.

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

QUINLIVAN, T. D.; ROBINSON, T. J. Numbers of spermatozoa in the genital tract after artificial insemination of progestagen-treated ewes. *Journal Reproduction Fertility*, v. 19, n.1, p. 73-86, 1969.

ROMANO, J.E. Effects of different stimuli of service on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology*, v.42, p.875–879, 1994.

ROMANO, J.E.; CHRISTIANS, C.; CRABO, B. Continuous presence of rams hastens the onset of estrus in ewes synchronized during the breeding season. *Applied Animal Behaviour Science*, v.66, n.1-2, p.65–70, 2000.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrus ewes affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, v.43, p.465–472, 1995.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES, C.; RIVERO, A.; ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, v.47, p.1479–1488, 1997.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Follicular Dynamics, oestrous synchronisation and superovulation in sheep. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, Suppl. 1, p.251–261, 2006.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal reproduction science*, v.104, n.2-4, p.227–37, 2008.

THOMPSON, J. G. E.; SIMPSON, A. C.; JAMES, R. W.; TERVIT, H. R. The application of progesterone-containing CIDR devices to superovulated ewes. *Theriogenology*, v.33, n.6, p.1297–1304, 1990.

TORRÈS, S.; COGNIÉ, Y.; COLAS, G. Sheep embryos obtained with different FSH-p. *Theriogenology*, v.27, n.2, p.407–419, 1987.

TROUNSON, A.O.; MOORE, N.W. Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination. *Australian Journal of Biology Science*, v.27, n.3, p.301-304, 1974.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; CADAVID, R. R.; OSORIO, J. H. Respostas foliculares e endócrinas em ovelhas após sincronização do estro usando progesterona, prostaglandinas (PGF 2 α) e gonadotrofinas. *Vet. Zootec.*, v.3, n.2, p.14–27, 2009.

VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; DE CARVALHO, B. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A.; HENRY, M. R. J. M. Biotécnicas da reprodução aplicada a pequenos ruminantes. *Brazilian Animal Science*, v.8, Supl. 1, p.1–17, 2009.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; TRESGUERRES, J. A. F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARRETA, C.; COCERO, M. J.. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domestic animal endocrinology*, v.30, n.2, p.76–87, 2006.

VEIGA-LOPEZ, A.; ENCINAS, T.; McNEILLY, A. S.; GONZALES-BULNES, A. 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, 2008.

VIÑOLES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*, v.51, p.1351–1361, 1999.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.

WHITTINGHAM, D.G. Culture of mouse ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.48, Supl.14, p.7-21, 1971.

CAPÍTULO 2

Superovulação em ovelhas da raça Santa Inês:

Estudo sobre métodos de acasalamento em programas de
superovulação de ovelhas da raça Santa Inês visando aumento da
produção de embriões

RESUMO

O efeito de dois métodos de acasalamento (monta natural e inseminação artificial) sobre a produção de embriões foi avaliado em ovelhas superovuladas. O estudo foi conduzido em Julho de 2011 e Fevereiro de 2012 no Estado do Rio de Janeiro (22° 27'S, 43° 39'O). Quinze ovelhas da raça Santa Inês, com 2 a 4 anos de idade, peso médio de $47,8 \pm 6,3$ kg e escore corporal médio de 3.3 ± 0.4 , foram submetidas a dois sistemas de acasalamento: Monta Natural (G_{MN}) e Inseminação Artificial (G_{IA}), e cada ovelha passou pelos dois tratamentos ($n=15/\text{grupo}$). Para a sincronização do cio base (CB), foram inseridas (Dia 0) esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona e mantidas por 6 dias. Vinte e quatro horas antes da retirada da esponja, as fêmeas receberam 300 UI de eCG e 0,0375 mg de cloprostenol por via intramuscular (i.m.). Doze horas após a retirada da esponja, as ovelhas receberam 0,025mg de GnRH i.m. O tratamento de superovulação começou 48 horas após o fim do tratamento de sincronização e consistiu em 5UI/kg de FSHp i.m. em 6 doses decrescentes, a cada 12 horas. Na primeira dose de FSHp, inseriu-se uma nova esponja. Na quinta, aplicou-se 0,0375mg de cloprostenol i.m. e a esponja foi retirada. Após a retirada da esponja, as ovelhas do G_{MN} foram acasaladas com um carneiro de fertilidade conhecida, a cada 12 horas, até o final do estro. As fêmeas do G_{IA} foram inseminadas com sêmen congelado, pelo método de laparoscopia, 36 e 48 horas após a retirada da segunda esponja. O desenvolvimento folicular e o momento das ovulações foram acompanhados pela avaliação ultrassonográfica em tempo real, a cada 12 horas. Seis ou sete dias após os acasalamentos, o número de CLs foi avaliado por laparoscopia e as ovelhas que apresentaram 4 ou mais CLs foram submetidas à colheita de embriões por laparotomia. As ovelhas do G_{MN} ovularam antes ($P<0,05$) das ovelhas do G_{IA} . A porcentagem de ovelhas que responderam ao protocolo de superovulação ($\geq 4\text{CLs}$) foi de 53,30% e 46,70% nos G_{MN} e G_{IA} , respectivamente. O número de estruturas totais recuperadas, a taxa de recuperação, o número de estruturas viáveis e a taxa de viabilidade não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos G_{MN} e G_{IA} . Porém o G_{IA} apresentou um maior ($P<0,05$) número de estruturas não fertilizadas em relação ao G_{MN} e uma maior taxa de não fertilização. O método de acasalamento não afetou a produção de embriões viáveis. O momento da inseminação artificial foi antecipado em relação ao momento em que as ovulações ocorreram no grupo G_{IA} .

Palavras-chave: Superovulação. Monta natural. Inseminação artificial. Produção de embriões. Ovelhas. Raça Santa Inês.

ABSTRACT

The present study was developed to assess the effect of two mating methods (natural mating and artificial insemination) on embryo yield in superovulated ewes. The trial was done in July and February in Rio de Janeiro (22° 27'S, 43° 39'W). Fifteen non-pregnant Santa Inês ewes, aging between 2 to 4 years, weighing 47.8 ± 6.3 kg and body condition score of 3.3 ± 0.4 , were randomly assigned into two groups. Both groups were superovulated using the same protocol and were mated by natural mating (G_{NM}) or laparoscopic artificial insemination (G_{AI}). Estrus was synchronized using intravaginal sponges containing 60mg of medroxyprogesterone acetate inserted (D0) and maintained for 6 days. On day 5, the ewes received i.m. injections of 300 IU of eCG and 0.0375mg of cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brazil). Twelve hours after sponge removal, 0.025mg of GnRH was administered i.m. Superovulation started 48 hours after the end of the synchronization protocol and consisted of 5 IU/kg of pFSH i.m. in six decreasing doses (25%/25%; 15%/15% and 10%/10%), at 12 hours intervals. At the first pFSH dose, new sponges were inserted. At the fifth pFSH dose, 0.0375mg of cloprostenol was administered i.m. and the sponges were removed. After the sponge removal, the G_{NM} was mated with rams of proved fertility, at 12 hours interval, until the end of the estrus. The ewes of the G_{AI} were inseminated with frozen-thawed semen 36 and 48 hours after sponge withdrawal. The follicular development and ovulation time were observed using real-time ultrasonography at 12 hours intervals. Six or seven days after mating, the number of CL was evaluated by laparoscopy and the females with 4 or more CLs were subjected to embryo collection by laparotomy. The time from sponge removal to ovulation was shorter ($P < 0.05$) in the G_{NM} . The percentage of ewes that was responsive to superovulatory treatment (≥ 4 CLs) was 53,30% and 46,70% in G_{NM} and G_{AI} , respectively. The number of recovered structures and the recovery rate, the number of transferable embryos and the viability rate did not differ among groups G_{NM} and G_{AI} ($P > 0.05$). However, the G_{AI} group showed a higher ($P < 0.05$) number of unfertilized oocytes and a higher unfertilization rate. The mating method did not affect the production of viable embryos. The time of artificial insemination was anticipated when considering the time of ovulation observed in G_{AI} .

Key-words: Superovulation. Natural mating. Artificial insemination. Embryo yield. Ewe. Santa Ines breed.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva exerce grande impacto sobre lucratividade da exploração de ovinos e visa um melhor desempenho zootécnico e econômico do rebanho, sendo afetada pelo manejo reprodutivo (CHAGAS *et al.*, 2007; SIMPLÍCIO, FREITAS & FONSECA, 2007). Em programas de MOTE as doadoras podem ser acasaladas por monta natural ou por inseminação artificial (FONSECA, 2005).

No acasalamento por monta natural, um dos esquemas que pode ser utilizado é a introdução do macho para as coberturas (1 macho:5 fêmeas) por 48 a 72 horas após a retirada do implante de progestágeno (BARI *et al.*, 2000; NAQVI, GULYANI & PAREEK, 2000; CORDEIRO *et al.*, 2003). Sabe-se que a presença do macho e o estímulo mecânico da cópula (“efeito cópula”) induzem a alterações neuroendócrinas sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, capazes de adiantar o pico pré-ovulatório de LH, estimulando o desenvolvimento folicular e a ovulação (ROMANO, 1994; ROMANO, CHRISTIANS, & CRABO, 2000; LUCIDI, BARBONI, & MATTIOLI, 2001; DELGADILLO *et al.*, 2009).

No entanto, em programas de MOTE que utilizam o acasalamento por monta natural é comum a ocorrência de falhas na fertilização. A estrutura sinuosa e diversificada da cérvix, o muco cervical e os protocolos de sincronização e superovulação interferem no transporte espermático, resultando em baixas taxas de fertilização (EVANS & ARMSTRONG, 1984; BARI *et al.*, 2000; FREITAS & RUBIANES, 2008; SIMONETTI *et al.*, 2008; ARASHIRO *et al.*, 2009).

A inseminação artificial intrauterina por laparoscopia (IA) é um método de acasalamento que permite a deposição do sêmen diretamente nos cornos uterinos, eliminando a barreira imposta pela passagem do sêmen ao longo do canal cervical e promovendo melhores taxas fertilização (BARI *et al.*, 2000; BICUDO, SOUSA & TAKADA, 2003; AZAWI & AL-MOLA, 2011). Esta biotecnologia também é estratégica para a intensificação do manejo reprodutivo e propicia melhores resultados nos programas de melhoramento genético (BICUDO, SOUSA & TAKADA, 2003; AZEVEDO & OLIVEIRA, 2012). O presente estudo tem como objetivo avaliar dois métodos de acasalamento (monta natural e inseminação artificial por laparoscopia), associados a um protocolo de superovulação no início da onda de crescimento folicular, em relação à produção de embriões viáveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, sob protocolo 166 (Anexo 2).

2.1. LOCAL, DELINEAMENTO E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Escola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada na cidade de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (22° 27' latitude sul, 43° 39' longitude oeste). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é classificado como Af, caracterizando-se por inverno seco e verão chuvoso, temperatura anual entre 18 e 23°C com precipitação pluviométrica anual variando de 2.000 a 2.600 mm³. Quinze ovelhas da raça Santa Inês foram submetidas a dois sistemas de acasalamento durante um protocolo de superovulação; cada sistema de acasalamento constituiu um grupo experimental (Tabela 1). Cada animal passou pelos dois tratamentos, ou seja, foram realizadas duas etapas, sendo que a primeira foi executada em Julho de 2011 e a segunda em Fevereiro de 2012, totalizando 15 repetições por tratamento.

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos Experimentais	
G_{MN}	Ovelhas cobertas no final do tratamento superovulatório (n=15)
G_{IA}	Ovelhas inseminadas por laparoscopia no final tratamento superovulatório (n=15)

Durante o experimento foram feitas leituras diárias das temperaturas máxima, mínima e de umidade, além do registro da precipitação pluviométrica (Tabela 2).

Tabela 2. Dados climatológicos durante o período experimental (média $\pm$ desvio padrão)

	1ª etapa Julho/11	2ª etapa Fevereiro/12	Média
Temperatura mínima (°C)	17,28 $\pm$ 3,56	22,00 $\pm$ 1,84	19,22 $\pm$ 3,82
Temperatura máxima (°C)	28,30 $\pm$ 3,41	34,46 $\pm$ 2,15	30,84 $\pm$ 4,28
Temperatura no globo negro (°C)	22,60 $\pm$ 6,00	30,38 $\pm$ 11,52	25,67 $\pm$ 9,34
Umidade (%)	85,20 $\pm$ 4,33	77,14 $\pm$ 12,64	81,88 $\pm$ 9,51
Precipitação pluviométrica (mm³)	1,25 $\pm$ 4,55	10,54 $\pm$ 37,29	5,07 $\pm$ 24,11

2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

2.2.1. Ovelhas

Foram selecionadas quinze ovelhas (5 pluríparas e 10 nulíparas) da raça Santa Inês entre 2 e 4 anos de idade, apresentando peso médio de $47,79 \pm 6,33$ kg e escore da condição corporal com média de $3,34 \pm 0,39$. As fêmeas foram submetidas a exame ginecológico por meio da ultrassonografia transretal em tempo real e do sistema genital externo, por inspeção.

2.2.2. Carneiros

Foi selecionado um carneiro como doador de sêmen (Alta Genetics - Estância Dolly TE 2657 - Mr Dically 0105445), oriundo de uma central de inseminação comercial, sendo utilizadas doses procedentes da mesma partida, destinadas à inseminação artificial por laparoscopia no G_{IA}. Para a detecção do estro nas fêmeas, foi utilizado um rufião (desvio lateral do pênis). Para as coberturas, foram selecionados dois carneiros. Todos os machos eram da raça Santa Inês e tinham fertilidade conhecida, não apresentando nenhum sinal de disfunção orgânica ou reprodutiva.

2.3. SINCRONIZAÇÃO DO CIO BASE E SUPEROVULAÇÃO

Os animais do G_{MN} e G_{IA} tiveram o cio base sincronizado de acordo com o protocolo citado por Cavalcanti et al. (2012). Neste protocolo, foi inserida uma

esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], Schering Plough, São Paulo, Brasil) que foi mantida por seis dias. Vinte e quatro horas antes da retirada da esponja foram administrados, por via intramuscular, 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®], Schering Plough, São Paulo, Brasil) e 0,0375 mg de cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). As ovelhas também receberam 0,025 mg de GnRH (Gestran Plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil), via intramuscular, 12 horas após a retirada da esponja de progestágeno, permitindo, desta forma, uma maior sincronização da ovulação no cio base. O tratamento superovulatório foi iniciado 48h após o fim do protocolo de sincronização do cio base. Para o tratamento superovulatório, utilizou-se 5UI/kg de FSHp (Pluset[®], Hertape Calier, Minas Gerais, Brasil), via intramuscular, em seis doses decrescentes (25%/25%, 15%/15% e 10%/10%), a cada 12 horas. No momento da aplicação da primeira dose de FSHp, foi inserida uma nova esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®] - Schering Plough, São Paulo, Brasil). Na aplicação da quinta dose de FSHp, as ovelhas também receberam 0,0375 mg de cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) via intramuscular e foi retirada a segunda esponja vaginal. O esquema do protocolo hormonal dos grupos experimentais está representado na Figura 1.

2.4. OBSERVAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTOS

Para avaliação do comportamento sexual das fêmeas ao final do protocolo de superovulação, o rufião, preparado por meio da técnica de desvio lateral de pênis, recebeu um peitoral com bloco marcador (Raidez[®], ITC, Paraná, Brasil) e foi colocado com as fêmeas do G_{IA} após a retirada da segunda esponja de progestágeno (Figura 1). As fêmeas foram observadas em relação aos sinais de manifestação do cio (aproximação do macho, ficar imóvel perto do macho, urinar, aceitar a monta). As ovelhas foram rufiadas por três dias, a cada 12 horas, sendo que o rufião era colocado com as fêmeas no final da tarde e retirado na manhã do dia seguinte. A cada dia, a cor do marcador colocado no rufião era trocada, permitindo a identificação de início e final do estro.

As fêmeas do G_{MN} foram aleatoriamente alocadas em dois lotes, sendo que em cada lote foi mantida a proporção de um macho para cada quatro ou três

doadoras. Os carneiros eram colocados com as fêmeas a cada 12 horas, permanecendo com as mesmas do final da tarde até a manhã seguinte. Este procedimento também foi iniciado no dia da retirada do segundo implante vaginal de progestágeno e repetido por mais dois dias (Figura 1). Nos carneiros, também foi colocado o peitoral com marcador, mudando-se a cor a cada dia, o que permitiu a identificação das fêmeas cobertas, assim como o início e final do estro. As fêmeas do G_{MN} também foram observadas em relação aos sinais de manifestação do cio (aproximação do macho, ficar imóvel perto do macho, urinar, aceitar a monta). As informações sobre o comportamento sexual dos animais também foram registradas em fichas próprias (Anexos 3, 4 e 7).

Quanto às inseminações artificiais por laparoscopia (IA), foram realizadas duas em cada ovelha, sendo a primeira 36h e a segunda 48h após a retirada da segunda esponja, como representado na figura 1. Foi feito o registro do momento das inseminações em fichas específicas (Anexo 6). Vinte e quatro horas antes das inseminações, as ovelhas foram colocadas em baias próximas ao centro cirúrgico. Fez-se necessário manter os animais em jejum alimentar de 24h e hídrico de 12h uma vez que eles, durante as inseminações, foram posicionados em decúbito dorsal, em macas apropriadas, com angulação aproximada de 45⁰, mantendo-se a cabeça mais baixa em relação ao restante do corpo (posição de *Trendelenburg*). Dessa forma, preveniu-se a ocorrência de refluxo e, conseqüentemente, a asfixia dos animais. Antes do início do procedimento, foi feita a tricotomia e antiseptia no local das incisões. Para este procedimento, utilizou-se, primeiramente, clorexidina degermante (Riohex[®] Degermante 2%, Rioquímica, São Paulo, Brasil) e, em seguida, clorexidina alcoólica (Riohex Alcoólico 0,5%, Rioquímica, São Paulo Brasil).

Para as inseminações artificiais, fizeram-se duas incisões pontuais na pele com lâmina de bisturi, paralelamente à linha alba, sendo uma em cada lado a, aproximadamente, 6 cm da linha média ventral e 3 cm a frente do úbere, por meio das quais foram introduzidos dois trocartes de 5 mm de diâmetro. Antes da inseminação, a cavidade foi insuflada com CO₂. Através do trocar do lado esquerdo foi inserida a óptica de 5 mm e 30⁰ (Óptica de laparoscopia, Karl Storz[®], Alemanha) para a localização dos cornos uterinos. O outro trocar foi destinado à passagem do aplicador de sêmen envolto em bainha de inseminação previamente preparada e com uma agulha de insulina na ponta (Bicudo, comunicação pessoal),

de forma que esta ficava protegida pela bainha e só era exposta quando o inseminador solicitasse.

Utilizou-se uma palheta de 0,25 mL de sêmen congelado, sendo que foi depositada metade da dose em cada corno uterino. O sêmen foi descongelado utilizando-se o descongelador eletrônico (Fertilize[®], Minas Gerais, Brasil) a 35°C por 30 segundos. Após a montagem do aplicador e concluída a inseminação, os trocartes e o ar foram removidos e realizou-se o curativo no local de inserção dos trocartes (spray com cloridrato de oxitetraciclina e hidrocortisona; ungüento veterinário - óxido de zinco, óleo de pinho, caulim e xilol - e spray com fenitroton, cloridrato de clorexidina e alumínio). Terminadas as inseminações, as ovelhas foram mantidas nas baias por dois dias para a execução do curativo. Depois deste período, foram levadas de volta para os piquetes, onde permaneceram até 24 horas antes da realização da laparoscopia pré-colheita de embriões.

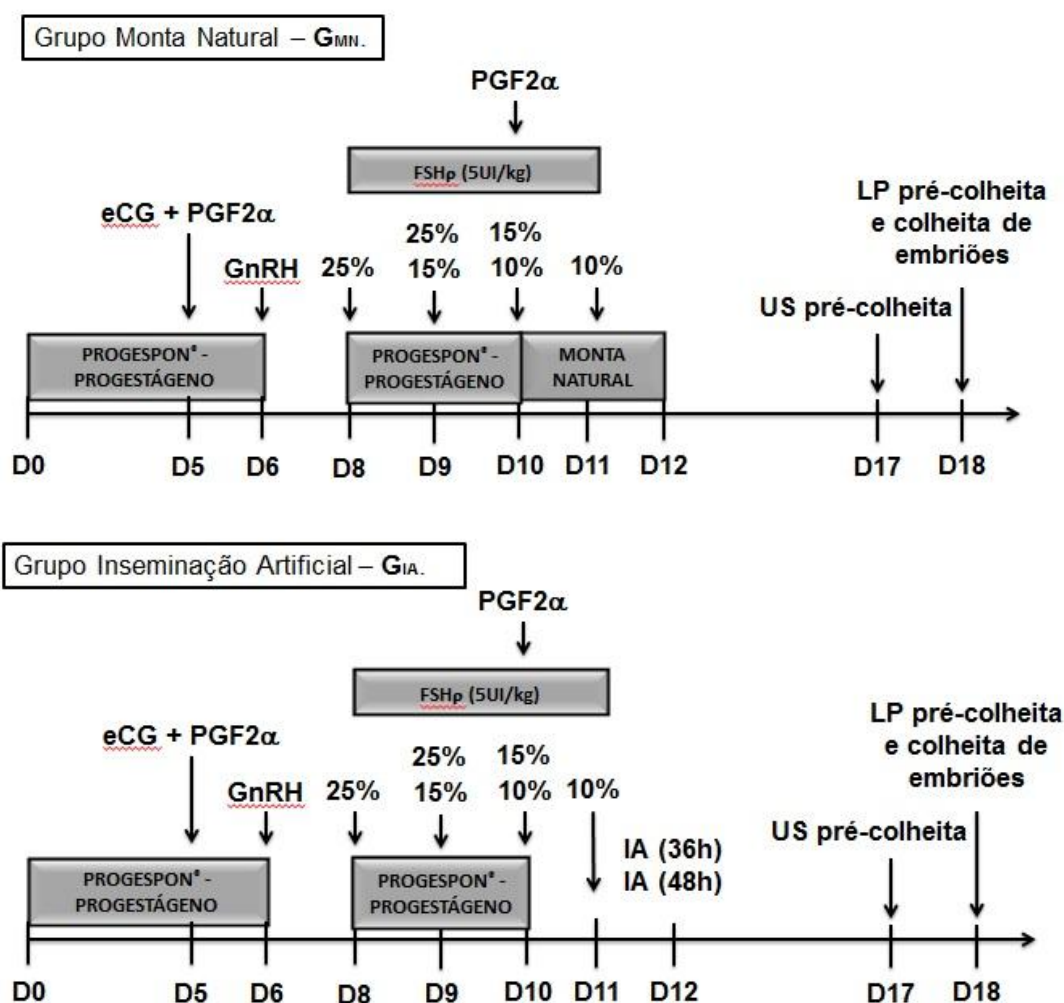


Figura 1. Esquema dos protocolos hormonais para sincronização do estro e superovulação em ovelhas Santa Inês, nos dois grupos experimentais.

2.5. ULTRASSONOGRRAFIA

Foi realizado o acompanhamento da dinâmica folicular ovariana em todas as ovelhas de cada grupo experimental, durante os tratamentos de sincronização e superovulação, para monitorar o desenvolvimento folicular e, conseqüentemente, determinar o número de folículos ovulados e não ovulados, o período de ocorrência das ovulações e o número de corpos lúteos formados (Anexos 5, 6 e 7). Este acompanhamento foi efetuado pelo mesmo operador, por meio da ultrassonografia transretal com auxílio de um transdutor nas frequências de 6,0 ou 8,0 MHz (Pie Medical®, modelo Águila Vet, Nutricell, São Paulo, Brasil). O transdutor linear foi adaptado com um tubo rígido fixado com uma fita adesiva, permitindo a introdução no reto das ovelhas e sua manipulação externamente. Durante os exames, as ovelhas foram mantidas em estação e a parede abdominal foi comprimida para facilitar a visualização do útero e dos ovários. O transdutor foi lubrificado com gel e introduzido no reto com a superfície de contato paralela à parede abdominal. Utilizada como janela acústica, a bexiga foi identificada e, imediatamente cranial à mesma, localizaram-se os cornos uterinos. Em seguida o transdutor foi lentamente girado para a esquerda e para a direita a fim de observar os ovários e suas estruturas. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas após o início do cio base e a cada 12 horas após a retirada da segunda esponja, até dois dias após o término do tratamento superovulatório.

2.6. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA E LAPAROSCÓPICA PRÉ-COLHEITA DE EMBRIÕES

Um dia antes da laparotomia para colheita dos embriões, foi realizada uma avaliação ultrassonográfica nas ovelhas para observação dos ovários em relação à presença de corpos lúteos e folículos anovulatórios (Anexos 5 e 8). A ultrassonografia foi realizada utilizando os mesmos equipamentos e procedimentos descritos no item 2.5.

Imediatamente antes da colheita de embriões, as fêmeas foram submetidas à laparoscopia para também avaliar os ovários em relação à presença e quantidade de corpos lúteos e folículos anovulatórios, sendo que os corpos lúteos foram

caracterizados quanto cor e ao grau de irrigação. A laparoscopia e o registro dos dados foram realizados como descrito no item 2.6.1 do capítulo 1.

2.7. COLHEITA E CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

Os embriões foram coletados seis ou sete dias após as coberturas e inseminações por meio da lavagem uterina cirúrgica, utilizando o método da laparotomia longitudinal mediana retroumbilical. Somente aqueles animais que apresentaram quatro ou mais corpos lúteos funcionais, observados na laparoscopia pré-colheita, foram considerados como responsivos ao tratamento de superovulação e submetidos à laparotomia para a colheita de embriões. Os procedimentos envolvendo a colheita de embriões, o pré e pós-cirúrgico, o armazenamento, a classificação e o congelamento dos embriões foram os mesmos descritos nos itens 2.6.2 e 2.6.3 do capítulo 1.

2.8. PROTOCOLOS ANESTESIOLÓGICOS

Os procedimentos anestésicos para as laparoscopias e laparotomias foram realizados como descritos no item 2.7 do capítulo 1.

2.9. CONTROLE DA DOR E MEDICAÇÃO PÓS-CIRÚRGICA

Logo após as laparoscopias (IA e pré-colheita) e a laparotomia, os animais foram mantidos em ambiente tranquilo (baías coletivas), sem estresse, com água e alimentação *ad libitum*. Após a laparotomia, os animais receberam durante três dias, a cada 24h, anti-inflamatório não-esteroidal (Maxicam[®] 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mg.kg⁻¹ i.m. e antibiótico (Tetradur[®] LA-300, Merial, São Paulo, Brasil) na dose de 20 mg.kg⁻¹ via i.m., a cada 48h, totalizando 3 aplicações.

2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, no qual as 15 ovelhas utilizadas foram submetidas aos dois tratamentos propostos em duas etapas, totalizando 30 superovulações. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SASTM.

As variáveis quantitativas (peso, intervalo da retirada da esponja ao início do estro, duração do estro, intervalo da retirada da esponja à primeira observação da ovulação, intervalo do final do tratamento de superovulação à primeira observação da ovulação, intervalo do início do estro à primeira observação da ovulação, corpos lúteos na ultrassonografia e na laparoscopia, número de estruturas totais coletadas e taxa de recuperação, número de estruturas viáveis coletadas e taxa de viabilidade, número de estruturas degeneradas e taxa de degeneração, número de estruturas não fecundadas e taxa de não fecundação e número de estruturas não viáveis e de zonas pelúcidas) foram expressas em média e desvio padrão da média e avaliadas pela análise de variância por meio do procedimento GLM. As médias foram comparadas pelo teste t Student, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

As variáveis qualitativas, expressas como respostas categóricas (frequência de ovelhas quanto aos períodos ovulatórios em relação ao momento da retirada da esponja, escore da resposta superovulatória e a média de corpos lúteos nos diferentes escores), foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

A correlação entre o número de corpos lúteos na ultrassonografia e na laparoscopia foi determinada pela correlação de Pearson.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AVALIAÇÃO DA MANIFESTAÇÃO DO ESTRO E DO MOMENTO DE OVULAÇÃO NO PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO

Devido ao protocolo de superovulação utilizado, a detecção do estro para determinar o momento de inseminação das ovelhas do grupo G_{IA} não seria necessária, visto que esta última foi realizada em tempo fixo. Porém, a avaliação do estro foi feita como uma ferramenta adicional para o melhor acompanhamento das respostas ao tratamento superovulatório.

Foi possível detectar o estro em 46,67% (7/15) das ovelhas do grupo G_{IA} e em 86,67% (13/15) das ovelhas do grupo G_{MN} . Estas ovelhas manifestaram sinais de estro nos dois dias após a remoção das esponjas de progesterona. Como pode ser observado na tabela 3, não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos em relação ao intervalo da retirada da esponja ao início do estro (primeira aceitação da monta).

Tabela 3. Avaliação dos intervalos (horas) de retirada da esponja ao início do estro (IRE); duração do estro (DE); retirada da esponja à primeira observação da ovulação (IRPO); fim da superovulação à primeira observação da ovulação (IFSOVPO) e início do estro à primeira observação da ovulação (IIEPO), no protocolo de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês (média $\pm$ desvio padrão)

	G_{IA}			G_{MN}		
	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.
IRE	31,79 $\pm$ 5,94 ^a (7) *	24,50	38,00	25,25 $\pm$ 10,38 ^a (13)	13,50	46,00
DE	29,89 $\pm$ 11,64 ^a (7)	12,87	43,50	26,66 $\pm$ 8,67 ^a (5)	16,00	38,00
IRPO	56,48 $\pm$ 15,39 ^a (13)	24,23	86,88	31,49 $\pm$ 12,24 ^b (11)	14,00	63,20
IFSOVPO	42,54 $\pm$ 15,48 ^a (13)	10,00	73,00	17,45 $\pm$ 12,19 ^b (11)	0,00	49,00
IIEPO	32,25 $\pm$ 18,57 ^a (5)	10,78	60,88	8,61 $\pm$ 5,99 ^b (7)	0,97	16,35

* os valores entre parênteses referem-se ao n

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$ - teste t Student).

Condições de estresse podem interferir na atividade reprodutiva das ovelhas (GORDON, 1997; PAPARGIRIS, *et al.*, 2011). O estresse pelo manejo excessivo dos animais devido à contenção das fêmeas para a administração dos protocolos hormonais, à realização de ultrassonografia, diariamente, e ao procedimentos associados à inseminação artificial por laparoscopia, pode influenciar no comportamento sexual, nas taxas de ovulação e aumentar a mortalidade dos embriões (GORDON, 1997).

Relata-se, em alguns estudos, que o aumento agudo ou crônico das concentrações de cortisol em situações de estresse, durante fases críticas do ciclo estral, pode interferir nos estímulos hormonais indutores do comportamento sexual e da ovulação (PAPARGIRIS *et al.*, 2011). Há evidências de que altas concentrações de cortisol durante situações de estresse alteram o aumento pré-ovulatório do estradiol produzido pelos folículos em crescimento, determinando, assim, alteração no feedback positivo do estradiol sobre a indução do pico de LH e sobre o estímulo da receptividade sexual (WAGENMAKER *et al.*, 2009; PAPARGIRIS *et al.*, 2011).

Como descrito no presente estudo, as ovelhas do grupo G_{IA} foram inseminadas 36 e 48 horas após a retirada da segunda esponja e, antes das inseminações, o estro ainda não havia iniciado em 7 ovelhas deste grupo, as quais não manifestaram cio até o final das observações. Embora não se tenha os dados das concentrações de cortisol ao longo do estudo, sugere-se que a situação de estresse provocada pelo manejo constante dos animais, associada ao procedimento de inseminação artificial, tenha ativado o eixo hipotalâmico-adrenal, aumentando a secreção de cortisol, como citado por Papargiris *et al.* (2011), e levando à interferência no estímulo do estradiol para a indução da manifestação do comportamento sexual destas ovelhas.

Possivelmente, este fenômeno explica a não observação de sinais de estro nestas fêmeas. No estudo de Papargiris *et al.* (2011), avaliando o efeito do estresse sobre o comportamento sexual, verificou-se que o início do estro não foi influenciado pelo aumento de cortisol, mas o aumento agudo ou crônico de cortisol reduziu a receptividade sexual das fêmeas. De acordo com esta descrição, é possível que a não manifestação do estro e, conseqüentemente, a não aceitação do macho por algumas fêmeas do presente estudo, podem ter sido conseqüência dos efeitos do estresse sobre o comportamento sexual.

O intervalo da retirada da esponja ao início do estro nos dois grupos experimentais do presente estudo foi inferior ao relatado por Cordeiro *et al.* (2003) que, ao utilizar um protocolo de superovulação com múltiplas doses de FSHp, observou um resultado de $44,0 \pm 3,8$ horas. A aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no momento da retirada do dispositivo de progestágeno, em protocolos de sincronização e indução da ovulação, encurta o intervalo para o estro (RUBIANES & MENCHACA, 2006; FREITAS & RUBIANES, 2008). Com isso, a utilização de $\text{PGF}_{2\alpha}$, no presente estudo, pode justificar o adiantamento do início do estro em relação ao observado por Cordeiro *et al.* (2003), que não associou $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao protocolo hormonal.

Oliveira *et al.* (2012), ao utilizar $\text{PGF}_{2\alpha}$ no final do tratamento superovulatório com FSH, observaram o início do estro $25,2 \pm 6,2$ horas após a retirada do dispositivo de progesterona, sendo próximo ao das fêmeas dos dois grupos experimentais (G_{IA} e G_{MN}), o que indica que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode exercer efeito de antecipação do estro, quando comparado aos estudos que não a utilizaram.

Foi constatado que a presença de um macho (carneiro ou rufião) é um dos fatores que influenciam tanto na manifestação do estro como no momento da ovulação, mesmo quando há o uso de protocolos hormonais de sincronização e indução da ovulação (VARAGO *et al.*, 2009; PACHECO & QUIRINO, 2010).

Em estudos sobre o efeito macho em ovelhas e cabras observou-se que a introdução de machos, durante o ciclo estral, induz ao estímulo para o aumento da secreção de LH e a manifestação do estro, podendo adiantar o início do estro (ROMANO, CHRISTIANS, & CRABO, 2000; DELGADILLO *et al.*, 2009). Além disso, o grau de exposição das fêmeas ao macho também pode influenciar no aparecimento do estro e na ovulação (ROMANO, ABELLA, & VILLEGAS, 2001).

Portanto, o intervalo da retirada da esponja ao estro também pode ter sido menor do que o descrito por Cordeiro *et al.* (2003) em virtude do maior grau de exposição das fêmeas ao macho ou rufião no presente estudo, durante o período de detecção do estro, visto que no estudo de Cordeiro *et al.* (2003) foi utilizada a monta controlada.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na duração do estro (intervalo entre a primeira e a última aceitação da monta) entre os grupos G_{IA} e G_{MN} (Tabela 3). Segundo Romano & Abella (1997) a ocorrência de cópula reduz a duração do estro, diferindo do que foi observado no presente estudo, pois a duração do estro nas

ovelhas do grupo G_{MN} não foi menor do que nas ovelhas do grupo G_{IA} , que foram apenas rufiadas utilizando um carneiro com desvio lateral do pênis.

O momento da ovulação, ou seja, quando o maior folículo antes identificado não estava mais presente, foi determinado por meio do exame ultrassonográfico em tempo real. Como pode ser observado na tabela 3, o intervalo da retirada da segunda esponja de progesterona até a primeira observação da ovulação foi maior ($P<0,05$) no grupo das ovelhas inseminadas (G_{IA}). Observou-se que as ovelhas do grupo G_{MN} ovularam, em média, 25 horas antes.

Quanto ao momento das ovulações em relação ao final da superovulação, houve diferença ($P<0,05$) entre os dois grupos experimentais, sendo que no grupo G_{MN} as ovelhas tiveram a ovulação antecipada em relação às fêmeas do grupo G_{IA} (Tabela 3). O momento da ovulação em relação ao início do estro também foi antecipado no grupo G_{MN} ($P<0,05$).

Foram observadas diferenças ($P<0,05$) quanto à distribuição dos períodos das ovulações em relação à retirada do segundo implante de progesterona, entre os dois grupos (Tabela 4). Um maior número de ovelhas do grupo G_{MN} (90,90% - 10/11) ovularam no P1 e no grupo G_{IA} a maioria das ovulações (84,62% - 11/13) ocorreram no P3. Em nenhum dos grupos ocorreram ovulações entre 42-48 horas (P2).

Tabela 4. Distribuição das ovelhas em relação ao período (P) da ovulação após a retirada da segunda esponja, ao final do protocolo de superovulação: P1: ovulação antes de 42 horas da retirada da esponja; P2: ovulação entre 42-48 horas após a retirada da esponja e P3: ovulação após 48 horas da retirada da esponja

	G_{IA}	G_{MN}
Ovelhas que ovularam antes de 42 horas após a retirada da esponja (%)	15,38 ^b (2/13)*	90,90 ^a (10/11)
Ovelhas que ovularam após 48 horas da retirada da esponja (%)	84,62 ^a (11/13)	9,09 ^b (1/11)

* os valores entre parênteses referem-se ao n

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$ - teste de Kruskal-Wallis).

Como descrito anteriormente, as ovelhas dos dois grupos experimentais foram expostas ao macho ou rufião por períodos iguais, sendo que a única diferença

entre os tratamentos foi a ocorrência da cópula no grupo G_{MN} . Segundo Romano (1994) e Romano & Abella (1997), o estímulo mecânico da cópula induzido pelo contato do pênis com o fórnix da vagina gera um mecanismo neuroendócrino sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, que provoca a redução da duração do estro mas não afeta o momento da ovulação em cabras, discordando do observado no presente estudo. No entanto, como descrito por Romano & Abella (1997), diferentes períodos de interação com o macho podem afetar o momento da ovulação.

Dessa forma, sugere-se que o período no qual os machos puderam permanecer com as fêmeas para acasalamento, associado à ocorrência da cópula nesse período, tenham antecipado a ovulação das fêmeas do grupo G_{MN} . Este mecanismo, envolvendo a influência do macho e da cópula sobre a duração do estro e o momento da ovulação, ainda não é totalmente esclarecido, mas segundo Lucidi, Barboni & Mattioli (2001) e Delgadillo *et al.* (2009), a exposição ao macho é capaz de adiantar o pico de LH e, conseqüentemente a ovulação.

Segundo Delgadillo *et al.* (2009), não é necessário que as fêmeas sejam expostas ao macho continuamente para que se obtenha o efeito de indução da ovulação, o que reafirma a hipótese de que houve efeito da cópula sobre o momento da ovulação no presente estudo já que, mesmo os machos (carneiro e rufião) tendo permanecido o mesmo tempo com as fêmeas dos dois grupos, intermitentemente, observou-se a antecipação da ovulação no grupo G_{MN} .

De acordo com o que foi descrito anteriormente, o aumento de cortisol em situações de estresse, como a realização de laparoscopia para as inseminações, pode provocar atraso ou bloqueio do pico de LH indutor da ovulação (MARTIN, OLDHAM, & LINDSAY, 1981; PAPARGIRIS *et al.*, 2011). Dessa forma, este fenômeno pode ter contribuído para o atraso das ovulações nas ovelhas do grupo G_{IA} , pois a segunda inseminação foi 48 horas após a retirada do segundo dispositivo de progestágeno e como pode ser observado na tabela 4, até este momento, 11 ovelhas deste grupo ainda não tinham ovulado. Assim, além da ausência do estímulo da cópula, isto pode explicar o fato das ovulações das ovelhas deste grupo terem sido cerca de 25 horas mais tarde em relação ao grupo G_{MN} .

3.2. DETERMINAÇÃO DE CORPOS LÚTEOS NA ULTRASSONOGRAFIA E NA LAPAROSCOPIA PRÉ-COLHEITA

Em relação aos dados de ultrassonografia pré-colheita (CLUS) e laparoscopia pré-colheita (CLLP), observou-se baixa correlação e não significativa ($r = 0,25$; coeficiente de correlação de Pearson, $P > 0,05$) entre o número de corpos lúteos (CL) visualizados nos dois momentos. Apesar das médias do número de CL visualizados no ultrassom e na laparoscopia ($5,08 \pm 4,47$ e $5,75 \pm 3,39$, respectivamente) terem sido semelhantes, possivelmente, esta baixa correlação deve-se à variação no número de CL observado nos dois momentos em uma mesma ovelha, como pode ser visualizado na figura 2.

Não foi possível realizar o ultrassom em quatro animais e em um animal o ovário não foi visualizado. Na laparoscopia, o ovário não pôde ser visualizado em uma ovelha devido à presença de aderência. Em uma segunda ovelha, a laparoscopia não foi realizada pois, pela avaliação ultrassonográfica, ela não havia respondido ao protocolo de superovulação.

Não foi possível determinar por meio do ultrassom o número de corpos lúteos com a precisão da laparoscopia. Este resultado discorda do que foi observado por Brandão *et al.* (2010), que constataram que houve correlação significativa entre as avaliações ultrassonográficas e laparoscópicas de corpos lúteos, após protocolo de superovulação. A possibilidade do uso do ultrassom evita a realização de laparoscopia nas fêmeas e pode ser útil em casos de aderências que dificultam a visualização laparoscópica dos ovários.

Segundo Dickie *et al.* (1999), vários fatores podem interferir na acurácia da avaliação ultrassonográfica para determinação de corpos lúteos, entre os quais as altas taxas de ovulação em ovelhas superovuladas que podem dificultar a individualização dos corpos lúteos e diminuir a precisão na contagem. Além disso, os mesmos autores afirmam que a experiência do operador do ultrassom é muito importante para a interpretação das imagens, pois operadores com pouca experiência podem ter limitações na identificação e diferenciação entre corpos lúteos e folículos, o que pode levar a super ou subestimação do número de CL.

Em vários estudos, a ultrassonografia ovariana é considerada, potencialmente, uma alternativa à laparoscopia na contagem de CL em ovelhas (DICKIE *et al.*, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2010). Com base no presente estudo, não

podemos sugerir a utilização da ultrassonografia para a determinação do número de CL, sendo importante considerar a possível interferência de fatores como os descritos acima no resultado da avaliação ultrassonográfica.

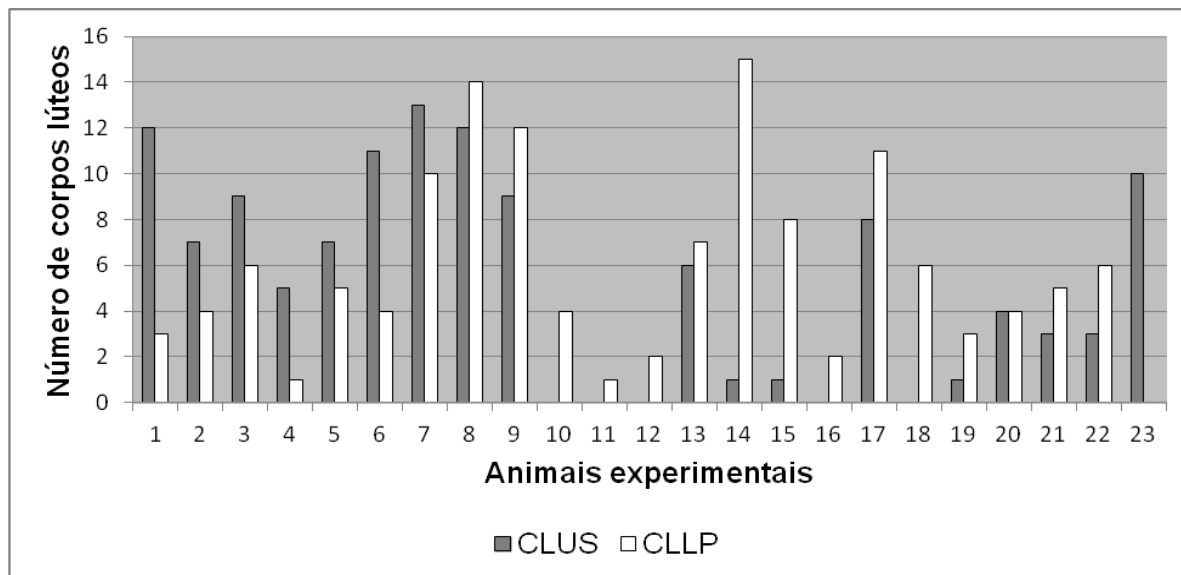


Figura 2. Histograma do número de corpos lúteos visualizados na ultrassonografia (CLUS) realizada no dia anterior ao da colheita de embriões e na laparoscopia (CLLP) logo antes da colheita de embriões, em função dos animais experimentais.

3.3. RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

A resposta superovulatória das ovelhas, avaliada pela contagem de corpos lúteos por laparoscopia no dia da colheita de embriões, foi de 46,70% (7/15) das fêmeas no grupo G_{IA} e 53,30% (8/15) das fêmeas no grupo G_{MN} , apresentando número de CL igual ou superior a 4 e submetidas à colheita de embriões.

As ovelhas apresentaram resposta ovariana média de $5,93 \pm 4,08$ e $5,57 \pm 3,91$ corpos lúteos, para os grupos G_{IA} e G_{MN} , respectivamente ($P > 0,05$). Verifica-se que houve uma grande variação do número de corpos lúteos observados em cada animal, evidenciada pelo alto valor do desvio padrão (Figura 2).

Esta resposta foi menor do que a obtida nos estudos de Cordeiro *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2012), nos quais 66,6% e 100% das ovelhas Santa Inês responderam ao protocolo de superovulação com FSHp, apresentando mais de 5 e 4 corpos lúteos, respectivamente. Além disso, as médias de ovulações observadas por Cordeiro *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2012) foram de $10,6 \pm 1,0$ e $10,5 \pm 1,2$, respectivamente. Dessa forma, verifica-se que não houve uma resposta satisfatória,

ao protocolo superovulatório, das fêmeas dos dois grupos quando comparada aos estudos anteriores, que utilizaram protocolos similares.

A sincronização do cio antes do início do tratamento superovulatório tem como objetivo permitir o início da superovulação no “Dia 0”, no qual a primeira dose de FSH é aplicada na emergência da primeira onda folicular (MENCHACA *et al.*, 2009; VARAGO *et al.*, 2009). Uma possível justificativa para a baixa resposta superovulatória, no presente estudo, seria a não sincronização do cio base. Portanto, sugere-se que algumas ovelhas não tenham respondido ao protocolo de sincronização, diferente do que foi observado no estudo de Cavalcanti *et al.* (2012), ao utilizar o mesmo tratamento de sincronização. Segundo os mesmos autores, a resposta ovulatória à aplicação de GnRH, ao final do protocolo de sincronização, depende do momento da aplicação e do tamanho do folículo ovulatório.

Quando o GnRH é aplicado em uma fase em que os folículos ainda não atingiram o tamanho pré-ovulatório, os mesmos não respondem à onda de LH induzida pelo pulso de GnRH e não ovulam, apenas continuam a crescer (WILTIBANK & HAUGHIAN, 2003), afetando a sincronização do cio base e a emergência de uma nova onda folicular. Dessa forma, o momento de aplicação do GnRH também pode ter influenciado na resposta das ovelhas, visto que no presente estudo este hormônio foi administrado 12 horas após a retirada do implante e Cavalcanti *et al.* (2012) administraram 24 horas após.

Três dos quinze animais (20%) que foram submetidos à colheita de embriões apresentaram folículos anovulatórios no dia da avaliação laparoscópica feita antes da colheita de embriões, porém, como tiveram uma resposta superovulatória satisfatória, optou-se por realizá-la.

Dos animais que não foram coletados (50% - 15/30), quatro apresentaram entre 4-5 CL, porém, como a resposta superovulatória foi média e estas ovelhas apresentaram folículos anovulatórios na avaliação por laparoscopia, elas não foram submetidas à colheita de embriões.

Do total das ovelhas não coletadas, 26,67% (5/15) apresentaram folículos anovulatórios na avaliação laparoscópica logo antes da laparotomia. Em três delas foi observado que o maior folículo no início do tratamento superovulatório apresentava diâmetro acima de 4 mm nos ovários correspondentes à observação dos folículos grandes no dia da colheita de embriões. Outras três ovelhas, que não responderam à superovulação, também apresentaram o maior folículo no início do

tratamento superovulatório com diâmetro acima de 4 mm. Nestas ovelhas, não foram observados folículos grandes no dia da avaliação laparoscópica, porém, elas apresentaram de 1 a 2 CL.

Assim, outro fator que pode justificar a baixa resposta superovulatória das fêmeas do estudo em questão é a presença de folículos grandes no início do tratamento superovulatório, concordando com os estudos de Rubianes *et al.* (1995) e Rubianes *et al.* (1997) ao verificarem que a presença de folículos em fase de dominância, no início do tratamento gonadotrófico, afetou a resposta superovulatória das ovelhas.

Estudos prévios consideraram que a resposta ovariana ao tratamento com FSH em ovinos estaria positivamente correlacionada com o número de folículos em recrutamento e negativamente associada ao número de folículos grandes no início do tratamento superovulatório (COGNIÉ, 1999; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002b; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002a)

Porém, estudos mais recentes descreveram que a dominância folicular pode ser fraca ou ausente nesta espécie e que a situação de codominância, possivelmente, ocorra em ovelhas com múltiplas ovulações (EVANS *et al.*, 2000; BARTLEWSKI *et al.*, 2011). Este fenômeno pode explicar a resposta ao protocolo hormonal de algumas ovelhas que apresentaram folículos maiores do que 4 mm no início da superovulação, pois nessas fêmeas a maior parte das estruturas recuperadas foram embriões viáveis, como pode ser observado na tabela 5. Observa-se, portanto, que a dominância folicular, assim como a sua influência sobre os resultados de superovulação e produção de embriões em ovelhas, ainda não estão totalmente esclarecidos e que outros fatores podem ter influenciado na resposta superovulatória das fêmeas deste estudo.

Tabela 5. Qualidade das estruturas recuperadas das ovelhas que apresentaram folículos menores ou iguais a 4mm, assim como das ovelhas que apresentaram folículos maiores que 4mm no início da superovulação

	FOLÍCULOS $\leq$ 4 mm	FOLÍCULOS $>$ 4 mm
Número de ovelhas	9	6
Estruturas totais	44	31
Embriões viáveis	30	20
Embriões degenerados	0	2
Estruturas não fertilizadas	14	9

Após o tratamento superovulatório, a quantidade de folículos anovulatórios detectados na laparoscopia representou apenas 6% das estruturas que se desenvolveram até o tamanho ovulatório, de acordo com a avaliação ultrassonográfica. Este resultado era esperado, já que estudos anteriores concluíram que há uma baixa incidência de folículos anovulatórios ao se utilizar preparados de FSH nos protocolos de superovulação (ARMSTRONG & EVANS, 1983; COGNIÉ, 1999; OLIVEIRA, 2011).

Foi observada regressão precoce de corpo lúteo em apenas duas ovelhas, as quais não responderam à superovulação, representando 6,67% do total de fêmeas do experimento. Verifica-se, então, que a ocorrência de corpos lúteos anormais foi pontual. Em estudo com ovelhas da raça Santa Inês, Cordeiro *et al.* (2003) não observaram este fenômeno, indicando que o mesmo não parece afetar, consideravelmente, a resposta superovulatória das ovelhas desta raça.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos em relação à distribuição da resposta superovulatória de acordo com o número de CL visualizados na laparoscopia, sendo que 57,14% dos animais do grupo G_{IA} e 50% do grupo G_{MN} tiveram resposta entre 4-10 CL (Tabela 6). Com base nestes dados e na classificação descrita por Cordeiro *et al.* (2003), observou-se que a maioria da ovelhas tiveram um resposta superovulatória média.

Tabela 6. Distribuição da resposta à superovulação dos dois grupos por meio da contagem de corpos lúteos na laparoscopia pré-colheita

	G _{IA}	G _{MN}
Ovelhas com menos de 4 corpos lúteos (não responderam à superovulação) (%)	28,57 (4/14)*	35,71 (5/14)
Ovelhas com 4 a 10 corpos lúteos (%)	57,14 (8/14)	50,00 (7/14)
Ovelhas com mais de 10 corpos lúteos (%)	14,29 (2/14)	14,29 (2/14)

*os valores entre parênteses referem-se ao n (P>0,05 - teste de Kruskal-Wallis).

Para a produção de embriões, é importante considerar que uma das ovelhas que respondeu à superovulação e foi submetida à laparotomia para colheita de embriões não teve estruturas recuperadas. Uma possível justificativa para a não recuperação de estruturas seria a falha na captação dos oócitos. Sabe-se que a manipulação das ovelhas para o procedimento de inseminação intrauterina, a taxa de preenchimento da cavidade abdominal com CO₂ e/ou a manipulação do útero durante a inseminação podem afetar a captação dos oócitos pelas fímbrias (BARI *et al.*, 2000). Porém, não foi possível determinar o quanto esses fatores influenciaram neste resultado.

Na tabela 7 e na tabela 8 podem ser observados os dados, dos dois grupos experimentais, referentes ao número de estruturas recuperadas e às taxas de recuperação de acordo com a qualidade embrionária, respectivamente.

Segundo Baldassare (2008), em um programa de superovulação, em média, 20 a 30% das fêmeas não ovulam, geram embriões degenerados ou não fertilizados ou apresentam regressão precoce de corpo lúteo. De acordo com o presente estudo, 46,6% das ovelhas não responderam ao tratamento de superovulação, tiveram recuperados somente embriões degenerados ou não fertilizados ou apresentaram regressão de corpo lúteo.

Tabela 7. Respostas das ovelhas ao tratamento superovulatório em relação à produção de embriões e qualidade das estruturas recuperadas, após a colheita dos embriões (média $\pm$ desvio padrão)

	G_{IA}			G_{MN}		
	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.
Ovelhas que responderam ao tratamento superovulatório (%)	46,70 (7/15)*	-	-	53,30 (8/15)	-	-
Estruturas totais	6,43 $\pm$ 2,44 ^a (7)	4	11	4,50 $\pm$ 3,02 ^a (8)	0	9
Estruturas viáveis	3,00 $\pm$ 2,89 ^a (7)	0	8	3,63 $\pm$ 2,00 ^a (8)	0	6
Estruturas degeneradas	0,29 $\pm$ 0,49 ^a (7)	0	1	0,00 $\pm$ 0,00 ^a (8)	0	0
Estruturas não fertilizadas	3,14 $\pm$ 3,08 ^a (7)	0	7	0,13 $\pm$ 0,35 ^b (8)	0	1
Estruturas não viáveis	3,43 $\pm$ 2,99 ^a (7)	0	7	0,13 $\pm$ 0,35 ^b (8)	0	1
Zona pelúcida	0,00 $\pm$ 0,00 ^a (7)	0	0	0,75 $\pm$ 1,75 ^a (8)	0	5

* os valores entre parênteses referem-se ao n

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05 - teste t Student).

Tabela 8. Respostas em relação à taxa de recuperação de estruturas, taxa de viabilidade, taxa de não fecundação e taxa de estruturas degeneradas, após a colheita dos embriões (média $\pm$ desvio padrão)

	G_{IA}			G_{MN}		
	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.
Taxa de recuperação (%)	74,04 $\pm$ 16,00 ^a (7)*	55,56	100,00	52,30 $\pm$ 26,47 ^a (8)	0,00	85,71
Taxa de viabilidade (%)	47,24 $\pm$ 45,29 ^a (7)	0,00	100,00	77,43 $\pm$ 37,10 ^a (8)	0,00	100,00
Taxa de não fecundação (%)	47,05 $\pm$ 45,28 ^a (7)	0,00	100,00	1,56 $\pm$ 4,42 ^b (8)	0,00	12,50
Taxa de degeneração (%)	5,71 $\pm$ 9,76 ^a (7)	0,00	20,00	0,00 $\pm$ 0,00 ^a (8)	0,00	0,00

* os valores entre parênteses referem-se ao n

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05 - teste t Student).

Os valores de estruturas totais e da taxa de recuperação (estruturas totais coletadas/número de corpos lúteos na laparoscopia X 100) não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos. A ausência de diferença entre as médias da taxa de recuperação, possivelmente se deve à grande variação entre as respostas das ovelhas do grupo G_{MN} , evidenciada pelo alto desvio padrão, o que levou a uma redução da média deste grupo.

No estudo realizado por Ramon-Ugalde *et al.* (2008), utilizando o mesmo método de colheita ou o método de colheita pelo oviduto, obteve-se uma taxa de recuperação de estruturas de 70%, que foi semelhante à do grupo G_{IA} e menor do que a do grupo G_{MN} . Com isso, sugere-se que a colheita pelo oviduto pode ser um método eficiente e mais simples de recuperação de embriões, por apresentar maior facilidade mecânica para a lavagem, visto que esta parte do trato reprodutivo é menor e requer um menor volume de meio para lavagem (RAMON-UGALDE *et al.*, 2008). Já no estudo de Bari *et al.* (2000), estratégias para melhorar a eficiência da técnica de semi-laparoscopia resultaram numa taxa de recuperação (83%) maior do que a dos grupos G_{IA} e G_{MN} . As técnicas de recuperação de embriões via oviduto ou por semi-laparoscopia modificada, apresentam-se, por conseguinte, alternativas que permitem a obtenção de melhores taxas de recuperação em relação à colheita pelos cornos uterinos por laparotomia longitudinal mediana retroumbilical.

Como pode ser observado na tabela 9, as ovelhas com 4 ou 5 CL apresentaram uma baixa taxa de recuperação em relação às ovelhas que apresentaram 6 ou mais corpos lúteos na avaliação laparoscópica. Com isso, verificou-se que a colheita de embriões em ovelhas com 5 ou menos corpos lúteos resulta em uma baixa taxa de recuperação. Portanto, sugere-se que a colheita de embriões em ovelhas com menos de 5 CL seja pouco viável em rebanhos comerciais, concordando com o estudo de Oliveira *et al.* (2012), no qual somente ovelhas com mais de 5 corpos lúteos foram consideradas como responsivas ao protocolo de superovulação com FSHp e foram submetidas à colheita de embriões.

Tabela 9. Estruturas recuperadas nas ovelhas dos dois grupos experimentais (G_{IA} e G_{MN}) que responderam ao protocolo de superovulação (4 ou mais CL) em relação ao número de corpos lúteos visualizados após avaliação laparoscópica

Corpos lúteos/animal	Número de animais	Número de corpos lúteos na laparoscopia	Total de estruturas recuperadas	Taxa de recuperação(%)
4 ou 5	2	9	4	44,4
6 a 10	9	66	42	63,6
> 10	4	52	35	67,3
Total	15	127	81	63,8

Em relação às médias de estruturas viáveis e da taxa de viabilidade (estruturas viáveis recuperadas /estruturas totais recuperadas X 100), também não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os dois grupos experimentais. Porém, o número de estruturas não fertilizadas e de estruturas não viáveis foi maior no grupo G_{IA} ($P<0,05$)

Já o número de estruturas degeneradas e a taxa de degeneração (estruturas degeneradas recuperadas/estruturas totais recuperadas X 100) não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). Como o número de estruturas degeneradas e a taxa de degeneração não diferiram ($P>0,05$), pode-se concluir que o maior número de estruturas não viáveis no grupo G_{IA} deve-se ao maior número de estruturas não fertilizadas. Consequentemente, observou-se uma maior ($P<0,05$) taxa de não fecundação (estruturas não fecundadas recuperadas/estruturas totais recuperadas X 100) no grupo das ovelhas inseminadas artificialmente.

Em ovelhas superovuladas com FSH e associação de eCG ao protocolo, inseminadas 42 e 48 horas após a retirada do implante, com sêmen congelado, pela mesma técnica do presente estudo, Oliveira *et al.* (2012) observaram uma taxa de recuperação de estruturas de $51,7\% \pm 10,2$, sendo menor do que obtida no grupo G_{IA} . Porém, a taxa de viabilidade das estruturas recuperadas no estudo de Oliveira *et al.* (2012) foi maior ($64,2\% \pm 14,5$) e, consequentemente, o número de estruturas não fertilizadas e a taxa de não fertilização foram menores em relação ao observado no grupo G_{IA} .

O uso de inseminação intrauterina por laparoscopia, realizada 48 horas após a retirada da esponja, resulta em uma alta taxa de fertilidade e baixa frequência de embriões degenerados, independentemente da taxa de ovulação. Com isso,

observa-se que não haveria comprometimento, pelo uso da superovulação com FSH, na habilidade intrínseca do oócito em ser fertilizado (COGNÍÉ, 1999). Baseado nessa afirmação, apesar da baixa taxa de degeneração, também esperava-se que a taxa de fertilidade das ovelhas inseminadas no presente estudo fosse maior.

Embora a taxa de recuperação do grupo G_{IA} tenha sido alta ($74,04\% \pm 16,00$), a taxa de viabilidade em relação às estruturas recuperadas foi baixa, devido à alta taxa de não fecundação.

Melhores resultados de fertilidade são determinados pela sincronia entre o momento da ovulação e da inseminação artificial (COGNÍÉ, 1999; VEIGA-LOPEZ *et al.*, 2008). Atualmente, em programas de superovulação associados à utilização de inseminação intrauterina com sêmen congelado, recomenda-se inseminar as doadoras 48 e 60 horas (BALDASSARE, 2008) ou 48 e 72 horas (SIMPLÍCIO, FREITAS & FONSECA, 2007) após a retirada da esponja. Como descrito anteriormente, as fêmeas do presente estudo foram inseminadas 36 e 48 horas após.

Portanto, considerando que as ovelhas do grupo G_{IA} apresentaram, em média, o momento da ovulação mais tardio e o momento da inseminação adiantado em relação ao descrito por Oliveira *et al.* (2012), acredita-se que o momento da inseminação tenha sido antecipado em relação ao momento das ovulações. Com isso, a menor viabilidade do sêmen congelado associada à assincronia entre inseminação e ovulação levaram à uma menor taxa de fertilização, o que resultou na alta taxa de não fecundação em relação ao grupo G_{MN} .

Verifica-se que a taxa de recuperação do grupo G_{MN} ($52,30\% \pm 26,47$) foi semelhante à descrita por Oliveira *et al.* (2012). No entanto, no grupo G_{MN} houve uma baixa taxa de não fecundação e uma taxa de viabilidade maior do que a obtida a partir da inseminação artificial com sêmen congelado no estudo anterior. Em estudos nos quais foram utilizados programas de superovulação e monta natural, observou-se bons resultados de fertilidade ao colocar o carneiro com as fêmeas entre 48 e 72 horas, a cada 12 horas, após a retirada do implante (CORDEIRO *et al.*, 2003; BALDASSARE, 2008). Portanto, o esquema de acasalamento aplicado no presente estudo foi eficiente para produzir boas taxas de fertilização.

Em ovelhas superovuladas com eCG associado ao GnRH, as fêmeas inseminadas via intrauterina por laparoscopia apresentaram menor taxa de não fertilização (8,4%) em relação às fêmeas acasaladas por monta natural (55,2%)

(AZAWI & AL-MOLA, 2011). Bari *et al.* (2000), também observaram que as ovelhas submetidas ao acasalamento por monta natural, após protocolo de superovulação com FSH, apresentaram menores taxas de fertilização em relação às ovelhas inseminadas por laparoscopia (75% versus 82%, respectivamente).

Diferentemente dos estudos anteriores, a taxa de fertilização das ovelhas acasaladas por monta natural, no presente estudo, foi maior do que a das ovelhas inseminadas ($77,43\% \pm 37,10$ versus $52,95\% \pm 45,28$, respectivamente), estando dentro do intervalo das taxas observadas em programas de MOTE (40-100%) utilizando monta natural (NAQVI, GULYANI & PAREEK, 2000; CORDEIRO *et al.*, 2003; AZAWI & AL-MOLA, 2011).

Os estudos anteriores que observaram uma baixa taxa de fertilização das fêmeas acasaladas por monta natural, atribuíram o resultado a uma falha na migração espermática transcervical e intrauterina, também descrita em outros estudos (BARI *et al.*, 2000; NAQVI *et al.*, 2001).

Assim, esperava-se uma melhor taxa de fertilização nas ovelhas do grupo G_{IA} em relação as do grupo G_{MN} , já que a técnica de inseminação intrauterina por laparoscopia permite que se ultrapassem as etapas do transporte espermático pelo ambiente hostil da vagina e da cérvix (McKELVEY *et al.*, 1985; HARESIGN, 1992; BARI *et al.*, 2000), que seria responsável pela perda de uma parte do sêmen por refluxo pela vagina e por seleção pelo muco presente (MORELLO & CHEMINEAU, 2008).

Embora não tenha sido possível determinar se este fenômeno ocorreu no presente estudo no grupo das ovelhas acasaladas por monta natural (G_{MN}), em virtude da baixa taxa de recuperação de estruturas destas ovelhas ($52,30\% \pm 26,47$), sugere-se que o protocolo de superovulação associado à monta natural não tenha comprometido o transporte espermático, discordando dos achados prévios (HAWK, COOPER & CONLEY, 1987; BARI *et al.*, 2000; NAQVI *et al.*, 2001).

Portanto, acredita-se que o principal fator para a diferença entre as taxas de fertilização dos dois grupos experimentais (G_{IA} e G_{MN}) seja a falha na fertilização das ovelhas do grupo G_{IA} , devido à inseminação artificial em momento não sincronizado com a ovulação, associada à menor viabilidade do sêmen congelado.

4. CONCLUSÕES

O método de acasalamento não afetou a produção de embriões viáveis e o acasalamento por monta natural não afetou as taxas de fertilização.

No grupo G_{IA}, o momento da inseminação artificial foi antecipado em relação ao momento em que as ovulações ocorreram, ou seja, não houve uma sincronia entre a realização das inseminações e as ovulações, o que levou à recuperação de um alto número de estruturas não fertilizadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANALYSIS SYSTEM FOR WINDOWS SASTM. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002.

ARASHIRO, E. K. N.; FONSECA, J. F.; HENRY, M.; FIGUEIRA, L. M.; MAGÃO, J. V. P.; OLIVEIRA, D. R.; ESTEVES, L. V.; BRANDÃO, F.Z. Efeito do protocolo de sincronização da primeira onda folicular sobre a resposta a superovulação em ovelhas da raça Santa Inês. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte (MG). *Anais... Belo Horizonte:Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. 572p. p.433.*

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Embryo Transfer in Sheep and Goats. *Theriogenology*, Vv.19, n.1, p.31–42, 1983.

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

AZEVEDO, H. C.; OLIVEIRA, A. A. Métodos racionais de acasalamento natural de ovinos. *Embrapa caprinos e ovinos. Publicado em 19 dez., 2012.* Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/publicações/documentos>> Acesso em: 29 jan. 2013.

BALDASSARE, H. Coleta e transferência de embrião. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet., 2008, 203p. Cap.11, p.143-152.

BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERREL, B. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose, and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. *Theriogenology*, v.53, n.99, p.727–742, 2000.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L.. Reproductive cycles in sheep. *Animal reproduction science*, v.124, n.3-4, p.259–68, 2011.

BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovinos refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.120-127, 2003.

BRANDÃO, F. Z.; ARASHIRO, E. K. N.; HENRY, M.; FIGUEIRA, L. M.; SOUZA, J. M. G.; VIANA, J. H. M.; FONSECA, J. F.. Evaluation of Superovulatory Response in Santa Inês Ewes by Ultrasonography and Laparoscopy. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, Supl.1 p. 242, 2010.

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

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; FERNANDES, L. B.; MACHADO, R.; ESTEVES, S. N.; SALES, R. L.; JUNIOR, W. B. Manejo Reprodutivo. In: _____ Ovinocultura: controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007, 44p. p28-38. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br>>. Acesso em: 22 nov., 2012.

COGNIÉ, Y. State of the Art in Sheep-Goat Embryo Transfer Theriogenology. *Theriogenology*, v.51, p.105–116, 1999.

CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, J. B.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FARIAS, L. N.; SALLES, H. O.; SIMPLÍCIO, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research*, v. 49,n.1, p,19–23, 2003.

DELGADILLO, J. A.; GELEZ, H.; UNGERFELD, R.; HAWKEN, P. A. R.; MARTIN, G. B. The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behavioural Brain Research*, v.200, n.2, p.304–314, 2009.

DICKIE, A. M.; PATERSON, C.; ANDERSON, J. L. M.; BOYD, J. S. Determination of corpora lutea numbers in Booroola-Texe ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, v.51, p.1209–1224, 1999.

EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M. P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, v.53, p.699–715, 2000.

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

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia (GO). Anais...Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, p.1–9 (Palestras).

FREITAS, V. J. F.; RUBIANES, E. Preparação das fêmeas: detecção e controle do estro e da ovulação. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.7, p.89-100.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J.; BAIRD, D. T. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reproduction in domestic animals*, v.37, n.6, 357–361, 2002a.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J. H.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D.T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*, v.57, n.4, p.1263–72, 2002b.

GORDON, I. A. N. *Controlled Reproduction in Sheep & Goats*. Volume 2. New York/USA: CAB International, 1997. 450 p.

HARESIGN, W. Manipulation of reproduction in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 45, p.127-139, 1992.

HAWK, H. W.; COOPER, B. S.; CONLEY, H. H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology*, v.28, n.2, p.139–153, 1987.

LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination. *Theriogenology*, v.55, n.01, p.1797–1805, 2001.

MARTIN, G. B., OLDHAM, C. M., & LINDSAY, D. R. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH and ovulation in the ewe. *Theriogenology*, v.16, n.1, p.39–44, 1981.

McKELVEY, W. A. C.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; HENDERSON, G. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, v.24, p.519-535, 1985.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v.72, n.4, p.477–483, 2009.

MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatômicas e funcionais do sistema reprodutor da fêmea. In: AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Med.Vet, 2008. 203p. Cap.2, p.11-25.

NAQVI, S. M. K.; GULYANI, R.; PAREEK, S. R. Effect of superovulatory regimens on ovarian response and embryo production in fine wool sheep in tropics. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v.13, n.5, p.595–599, 2000.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Research*, v.39, n.3, p.199–208, 2001.

OLIVEIRA, M. E. F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, Suppl. 1, p.29–35, 2011.

OLIVEIRA, M. E. F.; CORDEIRO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SOUZA, S. F.; PIERONI, J. S. P.; RODRIGUES, L. F. S.; FONSECA, J. F. F.; VICENTE, W.R.R. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? *Ciência Rural*, v.42, n.6, p.1077–1082, 2012.

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

PAPARGIRIS, M. M.; RIVALLAND, E. T. A.; HEMSWORTH, P. H.; MORRISSEY, A. D.; TILBROOK, A. J. Acute and chronic stress-like levels of cortisol inhibit the

oestradiol stimulus to induce sexual receptivity but have no effect on sexual attractivity or proceptivity in female sheep. *Hormones and behavior*, v.60, n.4, p.336–345, 2011.

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

ROMANO, J. E. Effects of different stimuli of service on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology*, v.42, p.875–879, 1994.

ROMANO, J. E.; ABELLA, F. D. Effect of service on duration of oestrus and ovulation in dairy goats. *Animal Reproduction Science*, v.47, n.1-2, p.107–12, 1997.

ROMANO, J.E.; CHRISTIANS, C.; CRABO, B. Continuous presence of rams hastens the onset of estrus in ewes synchronized during the breeding season. *Applied Animal Behaviour Science*, v.66, n.1-2, p.65–70, 2000.

ROMANO, J. E.; ABELLA, D. F.; VILLEGAS, N. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes. *Applied animal behaviour science*, v.73, n.3, p.193–198, 2001.

RUBIANES, E.; IBARRA, D., UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrus ewes affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, v.43, p.465–472, 1995.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑOLES, C.; RIVERO, A.; ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, v.47, p.1479–1488, 1997.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Follicular Dynamics, oestrous synchronisation and superovulation in sheep. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, Suppl. 1, p.251–261, 2006.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal reproduction science*, v.104, n.2-4, p.227–37, 2008.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.234–246, 2007.

VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; DE CARVALHO, B. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A.; HENRY, M. R. J. M. Biotécnicas da reprodução aplicada a pequenos ruminantes. *Brazilian Animal Science*, v.8, Supl. 1, p.1–17, 2009.

VEIGA-LOPEZ, A.; ENCINAS, T.; McNEILLY, A. S.; GONZALES-BULNES, A. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by

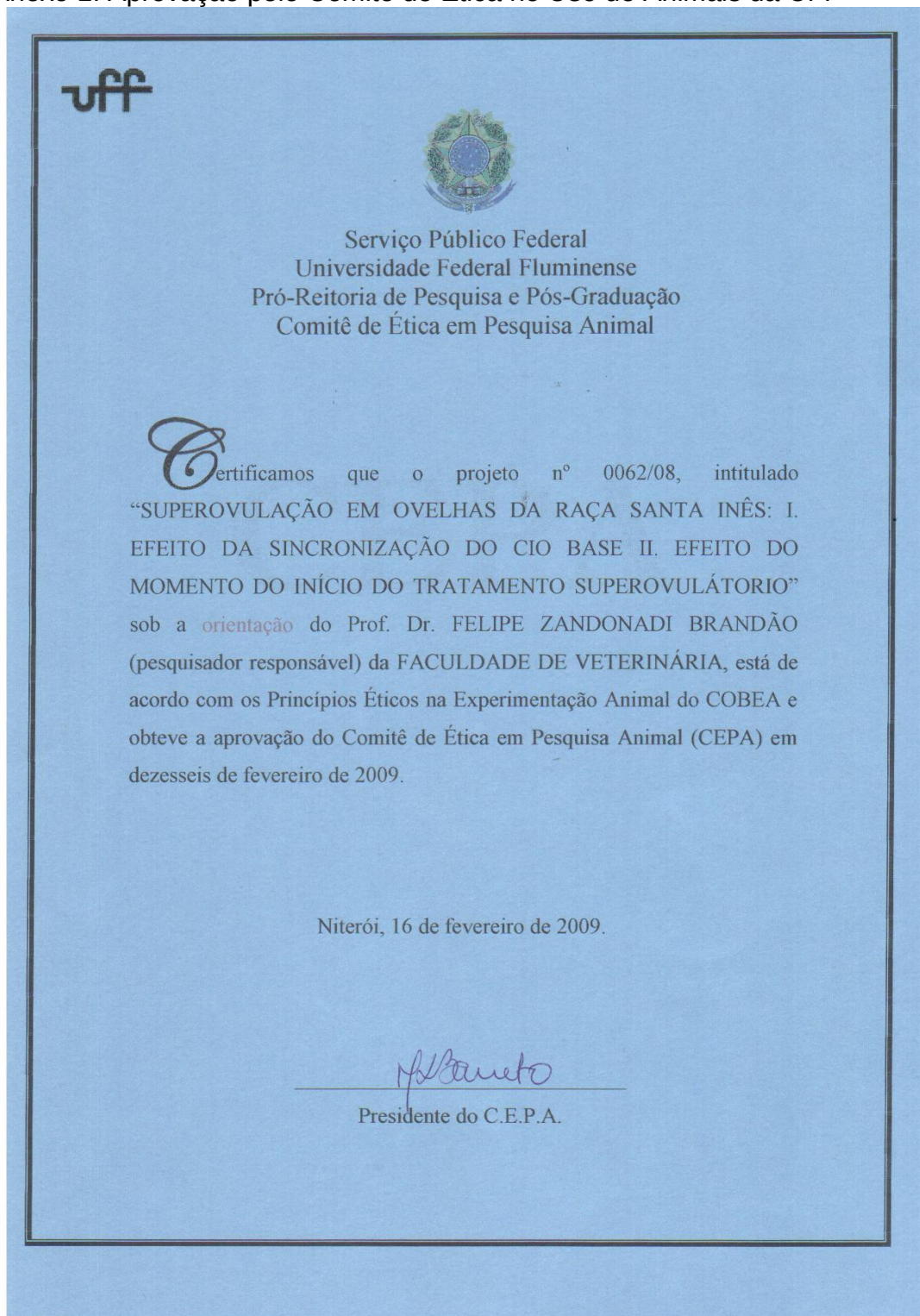
follicular status at start of the FSH treatment. *Reproduction in domestic animals*, v.43, n.1, p.92–98, 2008.

WAGENMAKER, E. R.; BREEN, K. M.; OAKLEY, A. E.; PIERCE, B. N.; TILBROOK, A. J.; TURNER, A. I.; KARSCH, F. J. Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. *Biology of reproduction*, v.80, n.3, p.458–463; 2009.

WILTBANK, M. C.; HAUGHIAN, J. M. GnRH: Bases fisiológicas para entender sua utilização em protocolos de sincronização. In: CONAPEC Jr. & CBRA: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 7, 2003, Passos (MG). *Anais...*, 2003. p.121-131.

6. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFF



Anexo 2. Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFF



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais



ertificamos que o projeto nº 70, intitulado “ESTUDO SOBRE MÉTODOS DE ACASALAMENTOS EM PROGRAMAS DE SUPEROVULAÇÃO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS VISANDO AUMENTO DA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES” sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão (pesquisador responsável) do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em nove de junho de 2011.

Niterói, 04 de julho de 2011.

Fabio Otavio Brandão

Presidente do C.E.U.A.

Anexo 3. Ficha de rufiação

RUFIAÇÃO

[illegible]

Anexo 4. Ficha de cobertura

COBERTURA

[illegible]

Anexo 5. Ficha de avaliação ultrassonográfica dos ovários

EXPERIMENTO SUPEROVULAÇÃO											
Planilha Reprodutiva - Dinâmica Ovariana											
Número		Raça				EXAME		RESP.			
DATA	HORA										
ovário esquerdo	DIMENSOES					ovário direito	DIMENSOES				
	nº fol		CL				nº fol		CL		
	< 3		Área				< 3		Área		
	3 a 5		Volume				3 a 5		Volume		
	> 5		Cavidade				> 5		Cavidade		
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLÍCULOS		1º maior		2º maior	
FOTO						FOTO					
Observações:											
DATA		HORA				EXAME		RESP.			
ovário esquerdo	DIMENSOES					ovário direito	DIMENSOES				
	nº fol		CL				nº fol		CL		
	< 3		Área				< 3		Área		
	3 a 5		Volume				3 a 5		Volume		
	> 5		Cavidade				> 5		Cavidade		
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLÍCULOS		1º maior		2º maior	
FOTO						FOTO					
Observações:											
DATA		HORA				EXAME		RESP.			
ovário esquerdo	DIMENSOES					ovário direito	DIMENSOES				
	nº fol		CL				nº fol		CL		
	< 3		Área				< 3		Área		
	3 a 5		Volume				3 a 5		Volume		
	> 5		Cavidade				> 5		Cavidade		
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLÍCULOS		1º maior		2º maior	
FOTO						FOTO					
Observações:											
DATA		HORA				EXAME		RESP.			
ovário esquerdo	DIMENSOES					ovário direito	DIMENSOES				
	nº fol		CL				nº fol		CL		
	< 3		Área				< 3		Área		
	3 a 5		Volume				3 a 5		Volume		
	> 5		Cavidade				> 5		Cavidade		
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLÍCULOS		1º maior		2º maior	
FOTO						FOTO					
Observações:											

Anexo 6. Ficha de registro do protocolo hormonal de superovulação, das inseminações, da duração do estro e das ovulações.

**DADOS SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS: IA, ESTRO,
OVULAÇÃO E COLETA**

Tratamento:			Data:		
Ovelha:			Peso:	CC:	
Hormônio:		Dose:		Lote:	
PGF2 α :		Dose:		Lote:	

PROGRAMA DE SUPEROVULAÇÃO

Datas						
Manhã						
Tarde						

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Data/Horário	Local	Identificação do sêmen	Observações

COMPORTAMENTO SEXUAL

	Início do Estro		Fim do Estro	
	Hora	Data	Hora	Data
Cio Base				
Cio Superovulação				

OVULAÇÃO

	Dia/hora	
	Última observação FOL	Primeira observação da ovulação
Cio Base		
Cio Superovulação		

Anexo 7. Ficha de registro do protocolo hormonal de superovulação, das coberturas, da duração do estro e das ovulações.

**DADOS SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS: COBERTURAS,
ESTRO, OVULAÇÃO E COLETA**

Tratamento:			Data:		
Ovelha:			Peso:	CC:	
Hormônio:		Dose:		Lote:	
PGF2 α :		Dose:		Lote:	

Protocolo:

PROGRAMA DE SUPEROVULAÇÃO

Manhã					
Tarde					

COBERTURAS

	Cobertura	Cobertura
Dia		
Hora		
Carneiro		
Obs		

COMPORTAMENTO SEXUAL

	Início do Estro		Fim do Estro	
	Hora	Data	Hora	Data
Cio Base				
Cio Superovulação				

OVULAÇÃO

	Dia/hora	
	Última observação FOL	Primeira observação da ovulação
Cio Base		
Cio Superovulação		

Anexo 8. Ficha de ultrassom pré-colheita, laparoscopia pré-colheita e estruturas coletadas.

ULTRASSONOGRAFIA – PRÉ-COLETA

Dia:		Hora:	
Operador:			
Avaliação Ovariana			
OE	Foliculos:	OD	Foliculos:
	_____		_____
	CLs: _____		CLs: _____
	_____		_____

COLETA

Dia:		Hora:	
DPBS:		Lote:	
Avaliação Ovariana - Laparoscopia			
OE	Foliculos:	OD	Foliculos:
	_____		_____
	CLs: _____		CLs: _____
	_____		_____
Estruturas Coletadas			
Total:		Viáveis:	
_____		_____	
Degenerados:		Não fertilizados:	
_____		_____	
Descrição das estruturas coletadas:			

Anexo 9. Classificação dos embriões quanto à qualidade.

Grau	Classificação	Aspecto
I	Excelente	Estádio de desenvolvimento com zona pelúcida intacta e esférica, massa celular homogênea com células de tamanho uniforme, nenhum ou poucos fragmentos celulares no espaço perivitelino
II	Bom	Alterações mínimas na forma e coloração com relação ao grau I, alguns fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino e/ou pequenas formações vesiculares nos blastômeros
III	Regular	Claras alterações comparadas com o grau II, embora com a maior parte da massa celular intacta
IV	Ruim	Muitos fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino, vesículas maiores e em maior número e claras mudanças degenerativas nos blastômeros, com menos da metade da massa celular intacta
V	Degenerado	Severas alterações como numerosos blastômeros extrusos, degenerados e de tamanhos variados; grande número de vesículas e alguma massa embrionária viável.
VI	Não fertilizado	Estruturas não fertilizadas

IETS (1990), com adaptações.