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

TARCÍSIO ALVES TEIXEIRA

USO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DO ESTRO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Niterói

2014

TARCÍSIO ALVES TEIXEIRA

USO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DO ESTRO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

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

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Co-orientador: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Niterói

2014

USO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DO ESTRO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

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

Aprovada em 18 de dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador

Faculdade de Veterinária – UFF

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca – Co-orientador

Embrapa Caprinos e Ovinos / Núcleo Regional Sudeste

Prof. Dr. Carlos Otávio de Paula Vasconcelos

Faculdade de Veterinária – UFF

Drª. Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan

LFCR – Faculdade de Veterinária – UECE

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Instituto de Zootecnia - UFRRJ

Niterói

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, que olha para a Terra todos os dias e me permite passar mais um deles por aqui.

Ao meu pai Joel, à minha mãe Nilma, e à minha irmã Carolina, por todo amor, carinho, muita paciência, e por todo apoio que me deram ao longo de todos esses anos, principalmente desde que entrei para a Veterinária!

À minha namorada Luana, pelo amor, paciência e companheirismo, em todas as horas e em todos os lugares! Aqui especificamente, pela ajuda no experimento, dando o seu sangue, literalmente, para que este trabalho pudesse ser realizado! Sem você ele não teria acontecido!

Ao Professor Doutor Felipe Zandonadi Brandão, por tudo que me ensinou, por todas as oportunidades que me deu desde a graduação, pela paciência, pelos conselhos e pela orientação na realização deste trabalho. Sua dedicação e disponibilidade são um exemplo a ser seguido por todos.

Ao Professor Doutor Walter Lilenbaum, pelas discussões de artigo e pela disciplina de Metodologia Científica. Tentei aplicar o que aprendi aqui neste trabalho.

Às professoras doutoras Maria Helena Cosendey Aquino e Helenita Marques Torres, pelo apoio, pelos conselhos e pela oportunidade de fazer a iniciação à docência na disciplina de Doenças Infecciosas.

A todos aqueles que me ajudaram na execução deste trabalho, principalmente a Luciano Carvalheira, Higor Lombardo, Anna Beatriz Veltri, Angélica Consalter, Leonardo Mayer, Ana Clara Sarzedas, Karina Frensel, Daniel Andrews, Ana Lígia Costa, Lucas Figueira e Ceci Ribeiro. Pela amizade, desprendimento e companheirismo. Sem vocês nada disto seria possível.

À Universidade Federal Fluminense, pela minha formação e pela estrutura que me ofereceu.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos durante o mestrado.

À Faperj, pelo financiamento deste trabalho.

“Tem que ter **trabalho”**

Muricy Ramalho

RESUMO

Este estudo avaliou a resposta de ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolos de sincronização e indução do estro. No ensaio 1, trinta e duas ovelhas foram divididas em três grupos. No D0, os animais receberam esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de MAP, que foram mantidas por seis ($G_{6\ dias}$, n=11), nove ($G_{9\ dias}$, n=11) ou doze ($G_{12\ dias}$, n=10) dias. Todos os animais receberam 75 µg de d-Cloprostenol IM e 300 UI de eCG IM um dia antes da retirada da esponja. Foram realizadas avaliações ultrassonográficas para monitoramento da dinâmica folicular e determinação do momento de ovulação. Depois da retirada da esponja, os animais foram submetidos à rufiação por três dias, até a detecção do final do estro. No ensaio 2, vinte e três ovelhas foram submetidas a duas doses de 0,48 mg de cloprostenol sódico IM, com intervalo de sete dias. Foram realizadas avaliações ultrassonográficas para monitoramento da dinâmica folicular e determinação do momento de ovulação. Depois de cada dose, os animais foram submetidos à rufiação por quatro dias, até a detecção do final do estro. Em ambos os ensaios, foi coletado sangue diariamente para dosagem de progesterona plasmática. No ensaio 1, os parâmetros de intervalo da retirada da esponja ao início do estro e de diâmetro final do maior folículo foram menores para o protocolo $G_{6\ dias}$ quando comparado aos protocolos $G_{9\ dias}$ e $G_{12\ dias}$ ($P<0,05$). $G_{9\ dias}$ apresentou menor dispersão do momento de ovulação quando comparado à $G_{6\ dias}$ e $G_{12\ dias}$. No ensaio 2, a taxa de manifestação de estro foi menor para a primeira dose em relação à segunda ($P<0,05$). A concentração de progesterona plasmática ao longo do protocolo foi menor entre os animais que estavam em diestro no D0 em relação aos que estavam em outras fases do ciclo estral no D0 ($P<0,05$), com os animais em diestro no D0 apresentando concentrações subluteais de progesterona durante a maior parte do tratamento. Pode-se concluir que, embora os protocolos de seis, nove e doze dias de MAP sincronizem o estro de forma eficiente em animais cíclicos e em anestro, o tratamento por nove dias promove menor dispersão do momento de ovulação; além disto, o protocolo de duas doses de prostaglandina com sete dias de intervalo, apesar de sincronizar o estro de forma eficiente, promove desenvolvimento folicular sob baixas concentrações de progesterona.

Palavras-chave: MAP, cloprostenol, sincronização de cio, progesterona, ovinos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the reproductive parameters of Santa Inês ewes subjected to estrus synchronization by the use of treatments with progestagen for six, nine or twelve days (experiment 1) and by the use of two doses of prostaglandin seven days apart (experiment 2). In the experiment 1, 32 ewes were allocated into three groups. In D0, animals received intravaginal sponges with 60 mg of MAP for six ($G_{6\ days}$, n=11), nine ($G_{9\ days}$, n=11) or twelve ($G_{12\ days}$, n=10) days. All ewes received 75 µg d-cloprostenol IM and 300 IU eCG IM one day before sponge removal. Ultrasonographic assessments were performed for monitoring follicular dynamics and to determine the ovulation time. After sponge removal, the animals were subjected to a teaser male for three days, or until the end of the estrus. Every day blood was collected to determine plasma progesterone concentration. In the experiment 2, 23 ewes were subjected to two doses of 0.48 mg sodic cloprostenol IM seven days apart. Ultrasonographic assessments were performed for monitoring follicular dynamics and to determine the ovulation time. After each doses, the animals were subjected to a teaser male for four days, or until the end of the estrus. Every day blood was collected to determine plasma progesterone concentration. In the experiment 1, the parameters of interval from sponge removal to onset of estrus and final diameter of the largest follicle were shorter for $G_{6\ days}$ treatment when compared to $G_{9\ days}$ and $G_{12\ days}$ treatments ($P<0.05$). $G_{9\ days}$ promoted a lesser dispersion in the time of ovulation when compared to $G_{6\ days}$ and $G_{12\ days}$. In the experiment 2, the estrus response rate was lower for the first application when compared to the second application ($P<0.05$). The plasma progesterone concentrations during the protocol were lower for the ewes that were in diestrus in D0 of the treatment when compared to the ewes that were in others stages of the estrous cycle ($P<0.05$). Animals in diestrus in D0 presented subluteals concentrations of progesterone during the largest part of the treatment. We can conclude that, although treatment with MAP for six, nine and twelve days promotes estrus synchronization and ovulation in anestrous and cyclic ewes, the treatment for nine days results in a lesser dispersion in the time of ovulation. Moreover, the protocol of two doses of prostaglandin seven days apart, although efficient in promoting estrus synchronization, leads to follicular development under low plasma progesterone concentrations.

Keywords: MAP, cloprostenol, estrus synchronization, progesterone, ewes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....p.14

2. REVISÃO DE LITERATURA.....p.16

2.1. ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA.....p.16

2.2. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR.....p.17

2.3. CICLO ESTRAL EM OVINOS.....p.20

2.3.1. Características gerais.....p.20

2.3.2. Proestro p.20

2.3.3. Estro.....p.21

2.3.4. Metaestro.....p.21

2.3.5. Diestro.....p.22

2.4. SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO.....p.23

2.4.1. Visão geral.....p.24

2.4.2. Implantes de progestágenos.....p.24

2.4.3. Aplicação de prostaglandinas.....p.28

3. OBJETIVOS.....p.32

3.1. OBJETIVO GERAL.....p.32

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....p.32

4. MATERIAL E MÉTODOS.....p.33

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO.....P.33

4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....P.33

4.3. AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS.....P.34

4.4. DETECÇÃO DE ESTRO.....P.35

4.5. INSEMINAÇÃO E COBERTURA.....P.36

4.6. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....P.37

4.7. COLETA DE SANGUE E DOSAGEM DE PROGESTERONA.....P.37

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....P.38

5. RESULTADOS.....p.40

5.1. ENSAIO 1.....p.40

5.2. ENSAIO 2.....p.46

6. DISCUSSÃO.....p.51

6.1. ENSAIO 1.....p.51

6.2. ENSAIO 2.....p.56

7. CONCLUSÃO.....p.61

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....p.62

9. ANEXOS.....p.67

9.1. ANEXO 1.....p.67

9.1.1. Certificado CEUA UFF.....p.67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos três protocolos hormonais utilizados. G6 dias: protocolo de seis dias de esponja; G9 dias: protocolo de 9 dias de esponja; G12 dias: protocolo de 12 dias de esponja. p.34

Figura 2. Distribuição do momento da primeira detecção de estro. Número de horas após a retirada da esponja. p.42

Figura 3. Distribuição do momento da primeira não-observação do maior folículo. Número de horas após a retirada da esponja. p.43

Figura 4. Concentração plasmática de progesterona ao longo do experimento. D11: eCG + PG. D12: retirada da esponja. Anova/Kruskal Wallis (P>0,05). p.44

Figura 5. Figura 5. Concentração plasmática de progesterona no dia de início de cada protocolo (D0), no dia da aplicação de prostaglandina e eCG e no dia da retirada da esponja de MAP. ANOVA/Kruskal-Wallis (P>0,05). p.44

Figura 6. Figura 6. Concentração plasmática de progesterona ao longo do experimento em todos os animais, nos animais em diestro no D0, e nos animais em outras fases do ciclo estral no D0. Números entre parênteses indicam número de observações. D0 e D7: aplicação de prostaglandina. Dias com asterisco: diferença (P<0,05) entre animais em diestro no D0 e animais em outras fases do ciclo estral no D0. ANOVA/Kruskal-Wallis. p.48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Resultados obtidos por diferentes autores com protocolos de sincronização de estro baseados em implantes de progestágenos e aplicação de prostaglandinas. p.31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Variáveis reprodutivas qualitativas em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno. p.40

Tabela 1.2. Variáveis reprodutivas quantitativas de ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno (média ± desvio-padrão). p.41

Tabela 1.3. Diâmetro final do maior folículo e do segundo maior folículo em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno (média ± desvio-padrão). p.43

Tabela 1.4. Concentração plasmática de progesterona (ng/ml) ao longo do experimento em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno (média ±desvio-padrão). p.45

Tabela 2.1. Taxas de manifestação de estro e de ovulação em ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização de estro com duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias. p.46

Tabela 2.2. Duração do estro e intervalo da aplicação ao início do estro em ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização de estro com duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias (média ± desvio-padrão). p.47

Tabela 2.3. Intervalos da aplicação da prostaglandina à ovulação, do início do estro à ovulação e diâmetros foliculares em ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização de estro com duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias (média ± desvio padrão). p.47

Tabela 2.4. Concentração plasmática de progesterona ao longo do experimento em todos os animais, nos animais em diestro no D0 e dos animais em outras fases do ciclo estral no D0 (média ±desvio padrão). p.49

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR.....Controled Internal Drug Release

CL.....Corpo Lúteo

E2.....Estrogênio

eCG.....Gonadotrofina Coriônica Eqüina

EGF.....Fator de Crescimento Epidermal

FGA.....Acetato de Fluorogestona

FSH.....Hormônio Folículo Estimulante

GnRH.....Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

GH.....Hormônio do Crescimento

hCG.....Gonadotrofina Coriônica Humana

IA.....Inseminação Artificial

IATF.....Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IGF.....Fator de Crescimento semelhante à Insulina

IGFBP.....Proteína de Ligação do Fator de Crescimento semelhante à Insulina

IGFR.....Receptor do Fator de Crescimento semelhante à Insulina

IM.....Via Intramuscular

IV.....Via Intravenosa

LH.....Hormônio Luteinizante

MAP.....Acetato de Medroxiprogesterona

PG.....Prostaglandina

PGF2α.....Prostaglandina F2α

P4.....Progesterona

®.....Marca Registrada

UI ..... Unidades Internacionais

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura está apresentando um ciclo de desenvolvimento mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento. Projeta-se para o Brasil uma multiplicação do rebanho da ordem de cinco vezes nos próximos vinte anos (Fonseca, 2005). Para atender o crescimento da atividade, haverá necessidade de se assistir a reprodução destes animais, seja para aumentar a eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, ou para multiplicação mais eficiente de animais com genótipo superior (Fonseca, 2005).

Os ovinos são animais poliéstricos estacionais, isto é, apresentam ciclos estrais regulares dentro da estação mais propícia para o acasalamento (Bartlewski, 2011). A ciclicidade reprodutiva em ovinos é favorecida pelo fotoperíodo curto, mais precisamente quando a duração do dia diminui em relação à duração da noite. Ciclos estrais regulares podem ser observados de meados do verão (estação de transição) ao início do inverno, sendo no outono o principal período reprodutivo dos ovinos (Rosa et al., 2003; Fonseca et al., 2005). O nascimento dos cordeiros se concentra em determinada época do ano (principalmente de meados do inverno ao início da primavera), e as fêmeas naturalmente irão parir somente uma vez ao ano. Desta forma, o potencial produtivo e comercial da espécie é limitado pela sua estacionalidade reprodutiva, que determina parições anuais e disponibilidade de cordeiros somente em certa época do ano (Fonseca, 2005).

A sincronização e indução do estro em ovinos são biotécnicas reprodutivas que permitem a concentração dos partos e a criação de cordeiros em épocas desejáveis dentro do sistema de produção, bem como o acasalamento das fêmeas fora da estação reprodutiva. Deste modo, com a sincronização de estro, o manejo de parto das matrizes e os cuidados com os recém-natos são facilitados, além de possibilitar a produção de lotes de cordeiros homogêneos para a venda e abate (Abecia et al., 2012). Através da indução do estro, a cobertura de fêmeas fora da estação reprodutiva permite a obtenção de até três partos em dois anos, no lugar da parição anual, além da obtenção de cordeiros em qualquer época do ano. Com estas biotécnicas, a implantação da inseminação artificial em um rebanho também é beneficiada, em virtude da

racionalização do processo de inseminação e da mão-de-obra, evitando que esta seja empregada de forma dispersa e onerosa. Programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) também são viabilizados pelo uso da sincronização de estro em conjunto com a prática da inseminação artificial.

A sincronização de estro em ovinos tem sido realizada por meio do uso de esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos, tais como acetato de fluorogestona (FGA) e acetato de medroxiprogesterona (MPA), prostaglandina F2α (PGF2α), gonadotrofina coriônica equina (eCG), dispositivos intravaginais de progesterona (P4), associados ou não (Dias et al., 2001). A indução de estro pode ser feita de maneira conjunta à sincronização de estro, o que demanda a utilização de uma gonadotrofina no protocolo de sincronização realizado fora da estação reprodutiva. Também pode ser feita de forma isolada, através do uso do efeito macho ou de programas de iluminação artificial, por exemplo, resultando em estro induzido com graus variáveis de sincronicidade (Fonseca, 2005).

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os efeitos sobre os parâmetros reprodutivos de ovelhas da raça Santa Inês de três diferentes tempos de permanência de esponjas intravaginais de MAP em um protocolo de sincronização e indução de estro (ensaio 1), e avaliar e descrever os efeitos sobre variáveis reprodutivas de um protocolo de sincronização de estro baseado em duas aplicações de prostaglandina com sete dias de intervalo entre as doses (ensaio 2).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA

Os ovinos são animais poliéstricos estacionais, apresentando vários ciclos estrais durante a estação reprodutiva. Em ovinos, a ciclicidade é favorecida pelo fotoperíodo curto (final do verão ao início do inverno), onde a secreção tônica de LH é estimulada pelo aumento das concentrações de estradiol. Durante a contra-estação reprodutiva (fotoperíodo longo, final do inverno ao início do verão), a secreção tônica de LH é inibida pelas baixas concentrações de estradiol produzidas pelos folículos em crescimento. Como resultado, observa-se uma baixa pulsatilidade de LH que não é capaz de assegurar o desenvolvimento folicular posterior à fase de emergência, o que ocasiona atresia folicular e impede a ocorrência de ovulação (Rosa et al., 2003). O padrão reprodutivo estacional dos ovinos contempla ainda uma fase de transição, caracterizada pelo retorno à ciclicidade. Esta fase de transição ocorre durante o final do verão, quando a quantidade de horas-luz começa a diminuir. A atividade reprodutiva também é afetada nos machos (Fonseca, 2005).

A secreção da melatonina, hormônio que é liberado pela glândula pineal durante a noite, tem duração aumentada durante o fotoperíodo curto. O aumento da duração da secreção da melatonina parece exercer efeito indireto, via sistema nervoso central, sobre o padrão de resposta dos neurônios produtores de GnRH ao estradiol, resultando em um aumento da liberação deste hormônio hipotalâmico. Isto levaria à elevação na secreção tônica de LH, com efeitos positivos sobre a ciclicidade reprodutiva (Rosa et al., 2003).

A estacionalidade reprodutiva em ovinos diminui na medida em que a latitude diminui, isto é, na medida em que se aproxima da linha do Equador. Em latitudes mais elevadas, como em regiões temperadas, esta estacionalidade é mais marcante (Sasa et al, 2002). Em latitudes tropicais, a estacionalidade reprodutiva não é tão destacada, e os animais podem apresentar ciclos estrais durante todo o ano (Rosa et al., 2003). Na verdade, outros fatores, como disponibilidade sazonal de alimentos, podem exercer

maior influência sobre a ciclicidade de ovinos em regiões tropicais. O fator raça também exerce forte influência. Ovinos de raças nativas (ou nativizadas) brasileiras, como Santa Inês e Morada Nova, normalmente exibem atividade reprodutiva durante todo o ano, mesmo em áreas próximas aos trópicos, o que não ocorre com ovinos lanados, como Ile de France, Suffolk e Merino (Fonseca, 2005).

Balaro et al. (2014), estudaram a ciclicidade de ovinos da raça Santa Inês na região sudeste do Brasil, a partir de dosagens quinzenais de progesterona plasmática. Eles observaram um baixo grau de estacionalidade reprodutiva, onde 30% dos animais não apresentaram nenhum período de anestro no decorrer do ano, sendo que 85,7% dos casos de anestro ocorreram entre os meses de setembro e dezembro (primavera).

Sasa et al (2002) analisaram a concentração plasmática de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no estado de São Paulo. As borregas da raça Santa Inês apresentaram atividade cíclica reprodutiva durante todo o período estudado, enquanto as borregas das raças Romney Marsh e Suffolk apenas no período de abril a julho, encontrando-se em anestro de agosto a novembro.

A partir destes estudos pode-se observar que em regiões tropicais ovinos da raça Santa Inês demonstram baixo grau de estacionalidade reprodutiva, tornando-os passíveis de sincronização de estro a partir de protocolos que dispensam o uso de gonadotrofinas, tais como eCG, essenciais quando a indução de estro é necessária.

2.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

O desenvolvimento folicular em ovinos se inicia ainda na vida uterina. Uma fêmea ovina nasce com entre 40.000 e 300.000 folículos primordiais. Os folículos primordiais consistem de um oócito na fase de diplóteno da prófase I circundados por uma única camada de células pré-granulosas escamosas.

Grande parte destes folículos primordiais sofrerá apoptose até o início da puberdade (Driancourt et al., 1993).

Os folículos primordiais são continuamente recrutados a partir do *pool* ovariano existente (Roche, 1996). Após o recrutamento destes folículos, suas células começam a sofrer transformações morfológicas, e eles não retornam ao estado anterior, progredindo até a ovulação ou entrando em atresia ao longo do caminho. Os folículos primários são caracterizados por um oócito circundado por uma camada de células da granulosa cuboidais, enquanto os folículos secundários possuem duas ou três camadas destas células. Nos folículos terciários (antrais ou de Graaf) se inicia o desenvolvimento das células da teca, enquanto o antro se forma a partir da coalescência de cavidades intrafoliculares repletas de fluido. Na puberdade, o desenvolvimento dos folículos terciários prossegue para o estágio pré-ovulatório, onde o oócito retoma a meiose até a metáfase II (Bartlewski et al., 2011).

As fases de desenvolvimento folicular, desde os pequenos folículos primordiais até a ovulação, podem ser dividas didaticamente em cinco fases. A fase de recrutamento, na qual alguns pequenos folículos primordiais são recrutados dentre o “pool” de folículos primordiais existente nos ovários, mediante fatores autócrinos e parácrinos; a fase de seleção, na qual alguns destes folículos continuam a crescer enquanto outros entram em atresia; a fase de emergência, na qual pequenos folículos antrais emergem de um *pool* de pequenos folículos antrais existentes, mediante fatores endócrinos (folículos gonadotrofina-dependentes) dando origem às ondas foliculares regulares do ciclo estral; a fase de divergência, na qual dentre os folículos que emergiram, um ou dois folículos têm sua taxa de crescimento destacada da dos demais, que regredirão e entrarão em atresia; e a fase de dominância folicular, fase pré-ovulatória na qual o folículo (ou folículos) que cresceu acima de 4 mm sofre desenvolvimento final, sendo esta uma fase LH-dependente. As fases de recrutamento e seleção ocorrem continuamente nos ovários, gerando o pool de pequenos folículos antrais; a fase de emergência, divergência e dominância ocorrem durante o ciclo estral em um padrão de ondas (Rubianes & Menchaca, 2003; Bartlewski et al., 2011). O termo “recrutamento” pode ser utilizado como sinônimo para a fase da emergência, e o termo “seleção” para a fase pós-

emergência na qual alguns folículos entram em atresia e outros progridem, antes da divergência folicular, dependendo dos autores (Ferreira, 2010).

A regulação do crescimento e desenvolvimento dos folículos desde o estádio de folículo primordial até o pré-ovulatório é resultado de uma complexa interação entre fatores endócrinos e fatores locais (Silva et al., 2006). Dentre os fatores endócrinos, pode ser destacado o papel das gonadotrofinas, tais como o Hormônio foliculo-estimulante (FSH) e o Hormônio luteinizante (LH). O FSH é essencial para o desenvolvimento de folículos antrais, sendo encontrados ainda receptores para este hormônio nas células da granulosa de folículos primários e secundários. O LH atua principalmente no desenvolvimento de folículos antrais na fase pré-ovulatória (Martins et al., 2008). Somatotrofinas também atuam sobre o desenvolvimento folicular. O Hormônio do crescimento (GH), secretado pela hipófise anterior, atua estimulando o desenvolvimento de folículos ovarianos, aumentando as concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Gong et al., 1997). O sistema IGF é composto pelo IGF-1 e IGF-2, seus receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e pelas suas proteínas de ligação (IGFBPs). IGF-1 é encontrada em células da granulosa de folículos antrais saudáveis enquanto IGF-2 é encontrada em células da granulosa de folículos saudáveis e atrésicos (Zhou et al., 1996). IGF-1 atua estimulando o desenvolvimento folicular, inclusive de folículos pré-antrais. Em ruminantes as concentrações de IGFBP 2, 4 e 5 aumentam em folículos atrésicos e diminuem em folículos em crescimento terminal; a queda das concentrações de IGFBPs está associada ao aumento de expressão de receptores de LH no folículo (Monget et al., 2002; Martins et al., 2008). Outros diversos fatores de crescimento locais, tais como “Kit Ligand”, Fator de crescimento epidermal (EGF), Ativina, etc., atuam sobre os folículos nas mais diversas fases de desenvolvimento; alguns destes, como “Kit Ligand”, estão relacionados até à ativação de folículos primordiais (Martins et al., 2008).

Estima-se que o tempo de crescimento folicular entre o recrutamento do folículo primordial e o estágio pré-antral (cerca de 0,2 mm de diâmetro) seja de aproximadamente 130 dias. Para alcançar 0,5 mm de diâmetro, 24 a 35 dias seriam necessários. Para atingir 2,2 mm de diâmetro, mais cinco dias. Finalmente, ele alcançaria o diâmetro pré-ovulatório (pelo menos 4 mm) cerca

de quatro dias depois (Bartlewski et al., 2011 apud Cahill & Mauleon, 1980 e Turnbull et al., 1977).

2.3 CICLO ESTRAL EM OVINOS

2.3.1 Características gerais

Os ovinos apresentam ciclos estrais de dezesseis a dezessete dias de duração, isto é, o período entre uma ovulação e outra. Apresentam três a quatro ondas foliculares durante o ciclo estral, com a ovulação de um ou dois folículos da última onda folicular, após a regressão luteal geralmente por volta do dia 14 do ciclo (Bartlewski et al., 2011). Segundo Bartlewski et al.(1999a), em animais de quatro ondas foliculares, estas emergem nos dias 1, 6, 10 e 13 do ciclo estral, em estudo com ovelhas Finn, e nos dias 0, 5, 9 e 12, em estudo com ovelhas Western White Face. Esse padrão de crescimento folicular em ondas foi estabelecido principalmente após o advento do uso da ultrassonografia nos estudos de dinâmica folicular (Souza et al., 1997).

O ciclo estral em ovinos pode ser dividido didaticamente em quatro fases: proestro, estro, meta-estro e diestro. Estas fases possuem eventos e características que auxiliam na diferenciação entre uma e outra.

2.3.2 Proestro

O proestro se inicia após a luteólise, e se caracteriza pelo aumento nas concentrações circulantes de estradiol produzido pelo folículo pré-ovulatório da onda folicular ovulatória (última onda do ciclo, cuja ocorrência coincide com o momento da regressão luteal). A elevação na concentração plasmática de estradiol ocorre graças à baixa concentração de progesterona plasmática nesta etapa do ciclo estral, em virtude da luteólise. A queda da concentração de progesterona possibilita o aumento da pulsatilidade de LH, que age sobre os receptores foliculares de LH, levando ao aumento da produção e secreção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório (Bartlewski et al., 2011).

A elevação na concentração plasmática de estradiol, em consequência do crescimento do folículo pré-ovulatório após a luteólise também provoca aumento da frequência do pulso de LH. Na realidade, esse aumento da pulsatilidade de LH está envolvido em um mecanismo de feedback positivo com a secreção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório. Ao mesmo tempo, o estradiol atua por meio de feedback negativo sobre a secreção hipofisária de FSH, de modo que no proestro a concentração plasmática desta gonadotrofina se encontra em níveis mínimos (Baird 1978); a inibina também atua nesta inibição exercida pelo folículo pré-ovulatório sobre o FSH (Bartlewski et al 2011).

2.3.3 Estro

Em um determinado momento, a alta concentração de estradiol circulante desencadeia o comportamento estral, caracterizando o início do estro. Pode-se considerar como início do estro o momento a partir do qual o animal começa a aceitar monta. Finalmente, a elevação da concentração plasmática de estradiol culmina em uma descarga de GnRH, que leva à um pico pré-ovulatório de LH, e também de FSH. Esse pico de LH ocorre cerca de 14 horas antes da ovulação (Rawlings et al., 1984). A liberação de FSH neste momento pode ser devido a um efeito da descarga de GnRH pré-ovulatória que se sobrepõe aos agentes inibitórios ovarianos (Bartlewski et al., 2011). Em ovinos, o estro tem uma duração modal de 29 horas, com a ovulação ocorrendo próxima ao final do estro (Gonçalves et al., 2008).

2.3.4 Metaestro

Após o fim do estro (quando o animal não aceita mais monta), tem início o metaestro. Neste momento, a inibição sobre FSH cessa, e uma nova onda desta gonadotrofina tem lugar entre 20 e 36 horas após a ovulação (Baird, 1978). O perfil plasmático de FSH coincide com a o padrão de surgimento das ondas foliculares, com a flutuação de FSH antecipando a emergência de uma nova onda folicular e apresentando uma periodicidade de aproximadamente quatro dias (Ginther et al., 1995).

O metaestro se caracteriza também pela formação do corpo lúteo a partir das células da teca e da granulosa foliculares, com a concentração plasmática

de progesterona se elevando gradualmente. As concentrações de progesterona se elevam entre os dias 3 e 7 do ciclo (a ovulação é o dia 0), até alcançar um platô por volta do dia 12 do ciclo estral (Bartlewski et al., 1999a).

O LH é crucial nesta fase de luteinização. O processo de luteinização se inicia logo após a ovulação. As células da teca e da granulosa foliculares se diferenciam morfológica e funcionalmente nas células luteais pequenas e nas células luteais grandes, respectivamente. O LH apresenta, nesta fase, baixa frequência pulsátil e amplitude que se eleva gradualmente, sobretudo ao final de uma onda folicular, momento em que um grande folículo está presente (Bartlewski et al., 2011).

A primeira onda folicular se inicia no dia 1 do ciclo estral, em um momento onde as concentrações plasmáticas de progesterona estão baixas, sendo esta progesterona produzida pelo corpo lúteo recém-formado. Essa primeira onda folicular é a de maior duração dentre as ondas não-ovulatórias e a ovulatória do ciclo estral, justamente pelas baixas concentrações de progesterona presentes, o que acarreta uma baixa inibição sobre a pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH) liberado pela adeno-hipófise. As concentrações de LH presentes neste momento permitem maior crescimento do folículo dominante da primeira onda folicular, de modo que este alcança maior diâmetro em relação aos folículos das demais ondas, com exceção da onda ovulatória ao final do ciclo (Bartlewski et al., 1999b).

2.3.5 Diestro

O diestro pode ser compreendido como o período que vai desde o estabelecimento da função luteal até a luteólise, que ocorre entre os dias 12 e 15 do ciclo estral em ovinos (Bartlewski et al., 2011). Com a elevação das concentrações de progesterona no decorrer do ciclo estral, a segunda e a terceira onda (em animais com quatro ondas) tem menor duração que a primeira, e o folículo dominante dessas ondas alcançam diâmetros menores. Pode-se dizer, portanto, que uma maior taxa de progesterona promove maior *turnover* folicular, ao passo que uma menor taxa de progesterona resulta em maior pulsatilidade de LH, o que prolonga a duração da fase de crescimento e da fase estática do folículo dominante da onda em questão (Leyva et al., 1998).

A concentração plasmática de progesterona também influencia no padrão de secreção de FSH. Na presença de baixas concentrações de progesterona, as isoformas menos glicosiladas de FSH liberadas pela hipófise são dominantes. Estas isoformas tem maior taxa de depuração, o que dificulta a ultrapassagem da concentração limiar de FSH para produzir a emergência de uma nova onda folicular. Já na presença de concentrações mais elevadas de progesterona, as isoformas mais glicosiladas de FSH passam a ser preponderantes. As isoformas mais glicosiladas tem menor taxa de depuração do sangue e meia-vida mais longa, facilitando que a concentração limiar de FSH para emergência de uma nova onda seja alcançada (Ulloa-Aguirre et al., 2001; Bartlewski et al., 2011).

No final do diestro, o estradiol secretado pelos folículos em crescimento durante as ondas foliculares do ciclo estral estimula a expressão de receptores de ocitocina nas glândulas endometriais. A ocitocina promove a liberação de PGF2α pelo endométrio, que chega ao ovário via mecanismo de contra-corrente entre a veia e vaso linfático uterino e a artéria ovariana, desencadeando a luteólise. O corpo lúteo em processo de regressão libera ocitocina, fomentando este mecanismo de feedback positivo. A ocitocina liberada pela neuro-hipófise também age no processo de luteólise (Flint & Sheldrick, 1986).

A queda na concentração de progesterona circulante também estimula a expressão de receptores de ocitocina pelo endométrio, de forma que o aumento da expressão destes receptores no endométrio pode ser detectado em torno de seis horas após a retirada de implante de progesterona em ovinos (Mann et al., 2001).

Segundo Evans et al. (2000), o diâmetro folicular final (isto é, o diâmetro do folículo no momento da ovulação) é de, em média, 6,2 mm para ovelhas com duas ondas foliculares, e de 6,4 mm para ovelhas com três onda foliculares. No entanto, um folículo já a partir de 4 mm pode ser considerado de tamanho pré-ovulatório (Bartlewski et al., 2011).

2.4 SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DE ESTRO

2.4.1 Visão geral

A sincronização de estro é uma biotécnica que permite o aprimoramento do manejo reprodutivo de um rebanho ovino. Ela consiste em fazer com que um determinado número de fêmeas apresente estro de forma sincronizada, geralmente num intervalo entre 24 e 72 horas. A partir da sincronização do estro das fêmeas, é possível concentrar em um dado intervalo de tempo a sua cobertura ou inseminação, o que racionaliza o uso da mão-de-obra e favorece o emprego de outras biotecnologias. A sincronização de estro também permite que a parição, a cria, o desmame e o abate de cordeiros seja feito em lotes padronizados, o que além de melhorar o aproveitamento da infra-estrutura, da mão-de-obra e dos insumos disponíveis, facilita a comercialização dos animais pelo produtor (Abecia et al., 2012). A indução de estro consiste em induzir o estro em um animal que se encontra em anestro. Esta biotécnica permite que as fêmeas sejam acasaladas fora da estação reprodutiva, abrindo caminho para a obtenção de três partos em dois anos. Isto representa um aumento de 50% do número de crias por animal por ano (Fonseca, 2005). Além disso, permite a obtenção de cordeiros em qualquer época do ano, superando a limitação natural do período de nascimento dos animais.

2.4.2 Implantes de progestágenos

Para se alcançar a sincronização de estro, vários tipos de tratamento têm sido adotados. Dentre os mais utilizados, segundo Dias et al. (2001), estão protocolos hormonais que utilizam implantes intravaginais de impregnados de progestágenos, tais como acetato de medroxiprogesterona (MAP), acetato de fluorogestona (FGA), a própria progesterona (CIDR), associados ou não com gonadotrofina coriônica equina (eCG), sendo esta última utilizada principalmente quando se deseja induzir o estro em um grupo de animais em anestro.

Em um protocolo de sincronização de estro, o objetivo da inserção do implante de progestágeno é impedir a ocorrência de estro e ovulação nos animais que estão sendo sincronizados. A elevação na concentração plasmática de progesterona causada pela inserção de um dispositivo intravaginal mimetiza a ação do corpo lúteo e inibe o pico pré-ovulatório de LH, além de reduzir a pulsatilidade da liberação de LH pela adeno-hipófise,

otimizando o ambiente hormonal para o desenvolvimento folicular durante o protocolo (Wiltbank et al., 2011).

Desse modo, após a inserção de um dispositivo intravaginal impregnado de progestágeno em um lote de animais, nenhum animal irá entrar em estro e ovular até que o dispositivo seja retirado. A remoção do dispositivo promove uma queda brusca na concentração de progestágenos, findando a inibição da pulsatilidade de LH e permitindo a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, agora de modo sincronizado. A depender do tempo de manutenção do dispositivo, poderemos ter no momento de sua retirada um corpo lúteo ainda funcional, o qual manteria os efeitos inibitórios sobre o LH; essa possibilidade pode ser contornada com o uso de um agente luteolítico (análogos da prostaglandina F2α) no dia da retirada do dispositivo ou no dia anterior à sua remoção.

Os progestágenos vêm sendo largamente utilizados para sincronização de estro em pequenos ruminantes (Bretzlaff & Romano, 2001; Rubianes & Menchaca, 2003). Tradicionalmente, os implantes de progestágenos são mantidos por um período de doze a catorze dias, os chamados protocolos longos (Corteel et al., 1988). Vários autores relatam a utilização de protocolos longos para a sincronização de estro em ovinos, tendo alcançado relativo sucesso. Ozyurtlu et al. (2010), em um estudo que utilizou esponjas intravaginais de 30mg FGA por 12 dias, obtiveram 87,5% de manifestação de estro e 70,8% de prenhez, com monta natural. Silva et al. (2010) obtiveram 100% de manifestação de estro, utilizando esponjas intravaginais de MAP 50mg durante 12 dias; neste trabalho, observou-se um intervalo de retirada da esponja ao estro de 67,3 horas (Quadro 1.1). Este intervalo fornece informações importantes para a tomada de decisão no manejo reprodutivo destes animais, como por exemplo, o momento ideal para inseminação dos animais submetidos ao protocolo.

Protocolos longos têm sido associados a baixas taxas de fertilidade quando comparados com estro natural. Esta baixa taxa de fertilidade tem sido atribuída ao envelhecimento do oócito no interior do folículo dominante, cuja ovulação é retardada em protocolos longos (Viñoles et al., 2001). Tal desequilíbrio ocorreria por causa de baixas concentrações plasmáticas de progestágenos

por um período prolongado, decorridas do longo período de permanência do implante. Estas baixas concentrações de progestágenos permitem uma elevação na pulsatilidade de LH, tendo como resultado um folículo grande, com elevada produção de estradiol, mas de baixa fertilidade (Levya et al., 1998; Bigelow et al., 1998; Johnson et al., 1996).

Rubianes & Menchaca (2003) afirmam que em caprinos, após o sexto dia de permanência do implante progestágeno, as concentrações de progesterona caem para valores subluteais; isto seria contrário ao desejado em protocolos de sincronização de estro, que seria promover uma alta concentração de progestágeno para que ocorra maior *turnover* folicular. Segundo Viñoles et al. (1999), concentrações subluteais de progesterona permitem crescimento folicular excessivo e persistência do maior folículo. Rubianes & Menchaca (2003) afirmam que em pequenos ruminantes que se encontram em anestro estacional, o uso de tratamentos longos não é justificável.

Protocolos curtos, com entre seis e nove dias de permanência de implantes progestágenos, têm sido testados como uma opção aos protocolos longos. Protocolos curtos evitariam a permanência por período prolongado de um folículo dominante e a ovulação deste em um estado envelhecido, com efeitos benéficos sobre a taxa de fertilidade (Letelier et al., 2009). Além disso, sua duração mais curta pode representar uma vantagem logística.

Ungerfield & Rubianes (1999) demonstraram que protocolos curtos (seis dias de CIDR, MAP ou FGA) foram suficientes para sincronizar estro em 90% das ovelhas tratadas, após estimulação com eCG. Santos et al., (2010), trabalhando com implante de 60mg de MAP por 9 dias em trinta animais, associado à aplicação de eCG, observaram uma taxa de sincronização de estro de 90%, com uma taxa de fertilidade de 86,66%, ao utilizar inseminação artificial intracervical com sêmen fresco 10 horas após detecção do estro. Neste estudo, o intervalo entre a retirada da esponja e o aparecimento de estro foi de 37,8 horas, com uma duração de estro média de 26,5 horas (Quadro 1.1).

A adoção de protocolos curtos se baseia nas informações mais recentes sobre a dinâmica folicular em pequenos ruminantes. Considerando que nestes animais uma nova onda folicular emerge em intervalos de entre 5 e 7 dias,

Rubianes & Menchaca (2003) abordam estudo em que, trabalhando com cabras leiteiras, foi possível observar duas situações possíveis quando um protocolo curto (prostaglandina no momento de inserção do CIDR com manutenção por 5 dias) é utilizado. Se no momento de inserção do implante um folículo grande emergido quatro ou mais dias antes estava presente, ele regredia (devido à alta concentração de progesterona proporcionada pelo dispositivo recém-implantado) e uma nova onda folicular emergia, obtendo-se um folículo grande e jovem no momento da retirada do implante; caso não houvesse um folículo grande no momento da inserção do implante, ou seja, uma nova onda folicular emergida concomitante à inserção do dispositivo, simplesmente um folículo dessa onda se desenvolveria e seria ovulado após a retirada do implante. Em todo caso, no momento da retirada do progestágeno, um folículo pré-ovulatório jovem estaria presente. Neste trabalho, com a administração de eCG no momento de retirada do implante, a ovulação ocorreu em torno de 60 horas após a remoção do dispositivo.

Protocolos longos se baseiam em um período de permanência longo o suficiente para que ocorra regressão espontânea do corpo lúteo, não necessitando de um agente luteolítico para que a ovulação possa ocorrer. Em contraste, em um protocolo curto existe a necessidade deste agente luteolítico, visto que no momento de retirada do implante é possível a presença de um corpo lúteo fisiologicamente ativo (Abecia et al., 2012).

Ao se utilizar um protocolo de sincronização de estro em um grupo de animais que se encontra em anestro estacional, o uso de uma gonadotrofina se torna necessário para indução de estro (Fonseca, 2005). A gonadotrofina mais utilizada nos protocolos de sincronização e indução de estro é a eCG. A eCG é uma gonadotrofina coriônica de origem equina, de alto peso molecular, produzida pelos cálices endometriais que se formam na placenta da égua gestante entre os dias 40 e 120 de gestação. Ela se liga a receptores tanto de FSH quanto de LH, mimetizando a ação dos dois hormônios. A aplicação de eCG visa promover crescimento folicular final e permitir ovulação em contextos de baixa produção de gonadotrofinas, isto é, principalmente durante o anestro estacional.No entanto, diversos protocolos utilizam eCG ao final do período de permanência do implante mesmo durante a estação reprodutiva, obtendo bons resultados (Abecia et al., 2012). A aplicação continuada de eCG, porém, induz

a formação de anticorpos anti-eCG, o que compromete a sua eficiência em empregos futuros (Baril et al., 1996).

2.4.3 Aplicação de prostaglandinas

Uma alternativa aos protocolos longos tradicionais, quando os animais apresentam ciclos estrais regulares (ou seja, na estação reprodutiva), é a utilização da prostaglandina F2α (PGF2α). Protocolos de sincronização de estro baseados em aplicação de prostaglandinas têm algumas vantagens sobre protocolos que utilizam implantes progestágenos. Dentre elas, pode-se destacar o menor custo, menor utilização de mão-de-obra e facilidade de aplicação. Protocolos baseados em progestágenos são geradores de potenciais contaminantes ambientais, através de resíduos de progesterona em implantes usados e/ou de antimicrobianos utilizados nos dispositivos intravaginais (Viñoles et al., 2011).

Vários análogos sintéticos têm sido desenvolvidos com o objetivo de retardar a rápida degradação metabólica da PGF2α natural. Dentre eles, o cloprostenol é o mais utilizado em ovinos. O cloprostenol é cem vezes mais potente que a PGF2α, tem meia-vida mais longa, e demonstra maior seletividade para os receptores do corpo lúteo que a PGF2α (Dukes et al, 1974; Fierro et al, 2013). Dentre os isômeros de cloprostenol, D e L, apenas o isômero D tem capacidade de se ligar aos receptores luteais e miometriais. Existem no mercado duas apresentações de cloprostenol: DL cloprostenol (mistura racêmica) e D-cloprostenol, sendo este último dez vezes mais potente que o primeiro, necessitando de doses menores (Re et al., 1994; Fierro et al., 2013).

Geralmente, os análogos da PGF2α têm aplicação intramuscular ou por via intravulvosubmucosal, com metade da dose habitual. Conforme revisado por Fierro et al., (2013), doses entre 50 µg e 125 µg são efetivas em promover luteólise e sincronizar estro em ovinos. O corpo lúteo ovino é responsivo à aplicação de prostaglandinas a partir do terceiro dia do ciclo estral (D0: ovulação). A regressão luteal e a queda na concentração plasmática de progesterona são mais bruscas quando análogos de prostaglandina são utilizados em relação à luteólise natural; entre 6 e 24 horas são necessárias para completa regressão luteal após aplicação de prostaglandinas, em

comparação com 72 horas após luteólise natural (Wiley et al., 1997; Fierro et al., 2013).

A resposta à administração de prostaglandinas vai depender da fase do ciclo estral em que o animal se encontra. Se houver um corpo lúteo funcional e responsivo à prostaglandina (por exemplo, entre os dias 3 e 14 do ciclo estral), a luteólise será induzida, interrompendo a inibição da progesterona sobre a pulsatilidade de LH, permitindo o desenvolvimento folicular, estro e ovulação. Caso não haja corpo lúteo responsivo no momento da aplicação (por exemplo, entre os dias 15 e 2 do ciclo estral), uma nova dose de prostaglandina em um intervalo determinado será necessária para induzir luteólise e provocar estro. Desse modo, após uma única aplicação de prostaglandina, alguns animais responderão e outros não, dependendo da fase do ciclo estral em que se encontravam no momento da aplicação (Deaver et al., 1986). Se o animal respondeu à primeira aplicação de prostaglandina, um intervalo de tempo deverá ser dado para que possa ocorrer luteinização do folículo ovulado e para que este novo corpo lúteo seja responsivo à administração de uma segunda dose de prostaglandina. Portanto, uma maior taxa de sincronização de estro pode ser esperada após duas doses de prostaglandina aplicadas em um determinado intervalo de tempo.

O intervalo entre a aplicação de prostaglandina e o início do estro irá variar de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular em que a ovelha se encontra no momento da aplicação. Caso esteja presente um folículo dominante em fase de crescimento, o intervalo entre a aplicação e o estro será menor do que quando o folículo dominante já estiver regredindo e uma nova onda folicular precisar emergir (Fierro et al., 2013).

Tradicionalmente, os análogos da PGF2α têm sido utilizados em dose única ou em doses intervaladas de dez dias (Fonseca, 2005). Acritopolou & Haresign (1980) encontraram 66% de ovelhas em estro após uma única aplicação de prostaglandina, com intervalo entre a aplicação e o estro de 37,7 ±1,6 horas; em comparação, Acritopolou et al. (1982) encontraram 95% de ovelhas em estro em até 72 horas após a segunda aplicação de prostaglandina, com um intervalo de 9 dias entre as aplicações (Quadro 1.1). Silva et al. (2010) obtiveram 100% de taxa de sincronização após a segunda dose, com intervalo

de nove dias entre as aplicações. Um intervalo da segunda aplicação ao estro de 66,0 ± 2,5 horas foi observado. Intervalos da segunda aplicação de prostaglandina à ovulação de 79 e 78 horas foram encontrados para doses intervaladas de 8 e 14 dias respectivamente, com as ovulações ocorrendo entre 43 e 100 horas para o primeiro tratamento e entre 67 e 89 horas para o último tratamento (Fairnie et al., 1977).

O encurtamento do intervalo entre as aplicações de prostaglandina para sete dias vem abrindo a possibilidade de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sobretudo por permitir maior sincronia de ovulações. Por exemplo, Fierro et al. (2011), utilizando duas doses de 125 µg de DL-Cloprostenol intervaladas de 7 dias, obtiveram 87% de ovelhas em estro e taxa de prenhez aos 30 dias de 63% com IATF 48 horas após a segunda aplicação.

Uma possível explicação para a maior sincronia de ovulações com intervalos menores entre aplicações seria o período em que a segunda dose de prostaglandina é administrada, entre o terceiro e quinto dia do ciclo estral. Neste período, os folículos dominantes da primeira onda folicular ainda estariam em fase de crescimento, ao passo que os corpos lúteos já se encontrariam responsivos à ação da prostaglandina (Menchaca e Rubianes, 2004).

No entanto, protocolos com intervalo reduzido entre as aplicações de prostaglandina têm apresentado taxas de fertilidade inferiores, apesar de apresentarem melhores taxas de sincronização em alguns casos. Uma possível explicação é o ambiente de baixa progesterona à que o folículo dominante da onda ovulatória é exposto após a segunda aplicação (Fierro et al., 2013).

Uma das limitações dos protocolos baseados em prostaglandinas é a necessidade de os animais estarem com corpo lúteo ativo, o que inviabiliza seu uso isolado em fêmeas em anestro estacional. Na estação reprodutiva, a utilização de protocolos baseados em administração intervalada de prostaglandinas dispensa a utilização de gonadotrofinas (Fonseca, 2005).

No quadro a seguir é apresentada uma compilação de diversos artigos publicados na área.

Quadro 1.1 Resultados obtidos por diferentes autores com protocolos de sincronização de estro baseados em implantes de progestágenos e aplicação de prostaglandinas.

Tratamento	**Animais em estro**	**Fertilidade**	**Intervalo da retirada / 2ª prostaglandina – estro**	**Intervalo da retirada / 2ª prostaglandina – ovulação**	**Trabalho**
MAP 60 mg durante 12 dias	-	-	-	88 - 96 horas	Levya et al (1998)
Progestágeno durante 6 dias + eCG	90%	-	-	-	Ungerfield & Rubianes (1999)
Progestágeno durante 6 dias + eCG	100%	57%	32,9 horas	59 horas	Cavalcanti (2008)
FGA 30 mg durante 12 dias	87,5%	70,8%	-	-	Ozyurtlu et al. (2010)
MAP 60 mg durante 9 dias	90%,	86,7%;	37,8 horas	-	Santos et al., (2010)
MAP 50 mg durante 12 dias	100%	-	67,3 horas	-	Silva et al. (2010)
Dupla prostaglandina intervalo de 8 dias	-	-	-	79 horas (43 - 100 horas)	Fairnie et al., (1977)
Única aplicação de prostaglandina	66%	-	37,7 horas	-	Acritopolou & Haresign (1980)
Dupla prostaglandina intervalo de 9 dias	95%	-	Em estro em até 72 horas	-	Acritopolou et al. (1982)
Dupla prostaglandina intervalo de 7 dias	-	-	40,6 horas	60,8 horas	Rubianes et al. (2003)
Dupla prostaglandina intervalo de 9 dias	100%	-	66,0 horas	-	Silva et al. (2010)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes protocolos de sincronização e indução do estro em ovelhas da raça Santa Inês.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar diferenças em variáveis reprodutivas aplicáveis ao manejo em protocolos de sincronização e indução de estro com implantes progestágenos durante seis, nove e doze dias.

- Analisar as variáveis reprodutivas de ovelhas submetidas a um protocolo de duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animal da Universidade Federal Fluminense, sob o protocolo de número 452 (Anexo 1).

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

Os ensaios foram realizados 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 Köeppen 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 2.600mm^3. O ensaio 1 foi realizado nos meses de agosto e setembro de 2013, e o ensaio 2 foi realizado no mês de maio de 2014. Os animais experimentais eram mantidos a pasto, com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum* e suplementação de concentrado com 18% de proteína bruta pela manhã (média de 250 gramas/animal/dia). Pela noite os animais tinham acesso a abrigo e volumoso fornecido no cocho (capim elefante).

4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

No ensaio 1, trinta e duas ovelhas da raça Santa Inês foram divididas em três grupos experimentais, alocadas aleatoriamente após estratificação por peso: $G_{6\ dias:}$ n=11; peso médio 44,97kg ±8,62; ECC médio 3,07 ±0,36; $G_{9\ dias}$: n=11; peso médio 43,49kg ±7,93; ECC médio 2,98 ±0,26; e $G_{12\ dias}$: n=10; peso médio 45,54kg ±7,06; ECC médio 2,93 ±0,17. Cada grupo foi separado em dois lotes (lotes 1 e 2), com um dia de diferença entre os tratamentos de cada lote, para viabilizar o manejo de observação do estro e acasalamentos. No D0, os animais receberam esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), que foram mantidas por 6 ($G_{6\ dias}$), 9 ($G_{9\ dias}$) ou 12 ($G_{12\ dias}$) dias. Todos os animais receberam 75 µg de d-cloprostenol IM (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e 300 UI de eCG IM (Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) um dia antes da retirada da esponja. O calendário do

experimento foi elaborado para que a retirada da esponja ocorresse simultaneamente nos diferentes grupos de mesmo lote (Figura 1).

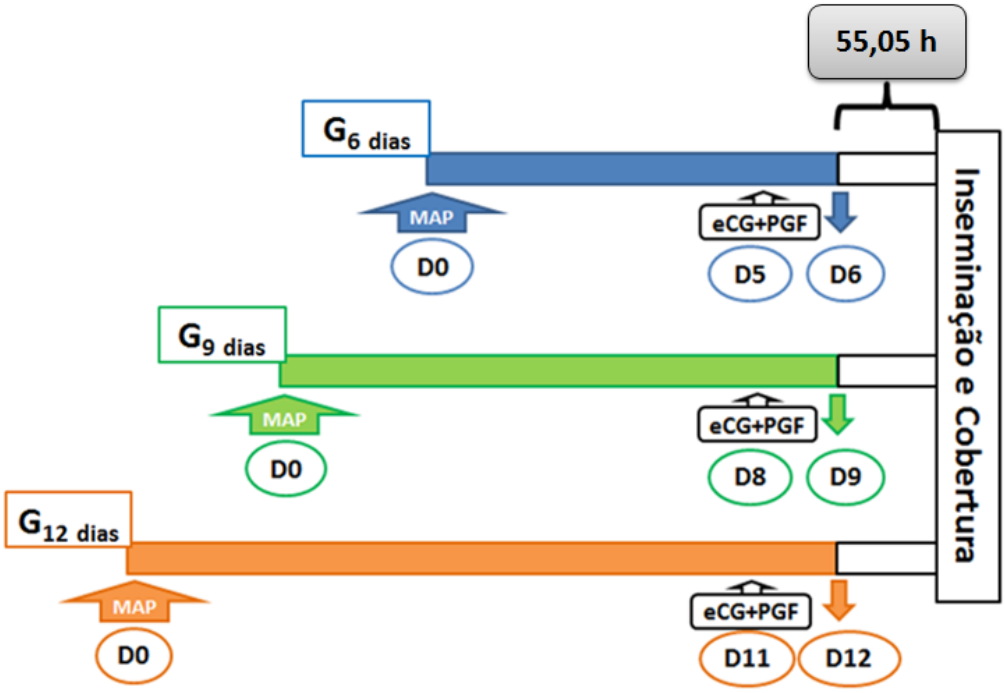

Figura 1. Esquema dos três protocolos hormonais utilizados. $G_{6\ dias}$: protocolo de seis dias de esponja; $G_{9\ dias}$: protocolo de 9 dias de esponja; $G_{12\ dias}$: protocolo de 12 dias de esponja.

No ensaio 2, vinte e três ovelhas da raça Santa Inês (peso médio 51,63kg ±6,7) foram submetidas a duas aplicações de 0,48 mg de Cloprostenol Sódico IM (Estron®, Agener, Brasil) intervaladas de sete dias (Figura 2).

4.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Durante todo o experimento foram realizadas avaliações ultrassonográficas (SonoScape®, modelo S6V, Shenzhen, China) com sonda linear transretal de 7,5MHz, acoplada a uma guia de PVC. No ensaio 1, estas avaliações eram efetuadas uma vez ao dia, no período matutino (a partir de 6h30m), após a inserção da esponja, e duas vezes ao dia, nos períodos matutino e vespertino (6h30m e 18h00), após a retirada da esponja. No ensaio 2, estas avaliações eram efetuadas uma vez ao dia, no período matutino (a partir de 6h30m), após

a primeira dose de prostaglandina, e duas vezes ao dia, nos períodos matutino e vespertino (6h30m e 18h00), até 96 horas após a segunda dose de prostaglandina.O diâmetro e posicionamento folicular, bem como a quantidade de folículos, a presença de corpos lúteos e o horário de avaliação foram anotados em fichas específicas.

No ensaio 1, foram mensuradas as variáveis de intervalo da retirada da esponja à ovulação, diâmetro final do maior folículo, diâmetro final do segundo maior folículo, taxa de ovulação e número médio de ovulações. No ensaio 2, foram mensuradas as variáveis de intervalo da aplicação de prostaglandina à ovulação, diâmetro final do maior folículo, diâmetro final do segundo maior folículo, diâmetro final do maior folículo após 2ª dose em animais em diestro no D0 (P4 > 1ng/ml no D0), diâmetro final do maior folículo após 2ª dose em animais em outras fases do ciclo estral no D0 (P4 > 1 ng/ml no D0), taxa de ovulação e taxa de dupla ovulação.

Para estas mensurações só foram considerados os animais que ovularam até 96 horas após a retirada da esponja (ensaio 1) ou aplicação de prostaglandina (ensaio 2). O momento de ovulação foi definido como o horário médio entre a última visualização e a primeira não-observação do folículo dominante (>5mm) após a retirada da esponja/aplicação de prostaglandina. Somente folículos acima de 3 mm foram considerados para os cálculos de diâmetro folicular. Foi definida como dupla ovulação a não-visualização, em uma sessão de ultrassonografia após a retirada da esponja/aplicação de prostaglandina, do folículo dominante e do segundo maior folículo quando este tinha diâmetro igual ou superior a 4 mm.

4.4 DETECÇÃO DE ESTRO

No ensaio 1,após a retirada da esponja as ovelhas foram submetidas à rufiação para detecção de estro duas vezes ao dia (7h00 e 18h00), durante três dias, ou até que o animal uma vez em estro não demonstrasse mais sinais de cio. No ensaio 2, vinte e quatro horas após a primeira dose de prostaglandina, e imediatamente após a segunda dose de prostaglandina, as ovelhas foram submetidas à rufiação para detecção de estro duas vezes ao dia (7h00 e

18h00), durante quatro dias, ou até que o animal uma vez em estro não demonstrasse mais sinais de cio. Durante as sessões de rufiação, o macho era colocado em um aprisco com um grupo de cinco ou seis ovelhas, durante cinco ou seis minutos (1 minuto/animal). Foi considerado como em estro a fêmea que aceitasse a monta do rufião e permanecesse parada em estação. Assim que uma ovelha era detectada em estro, esta era imediatamente retirada e então acrescentado mais um minuto para o grupo em questão. Ovelhas que sofriam perseguição individual persistente por dois minutos consecutivos sem aceitar monta eram retiradas, e mais um minuto acrescentado para detecção de estro no grupo.

No ensaio 1, foram mensuradas as variáveis taxa de manifestação de estro, duração do estro, intervalo da retirada da esponja ao início do estro e intervalo do início do estro à ovulação. No ensaio 2, foram mensuradas as variáveis taxa de manifestação de estro, duração do estro, intervalo da aplicação de prostaglandina ao início do estro e intervalo do início do estro à ovulação. No ensaio 2, para estas variáveis (exceto taxa de manifestação de estro), só foram considerados os animais cujo início do estro pôde ser determinado; animais que já se apresentavam em estro na ocasião da primeira sessão de rufiação não entraram nestas análises.

O início do estro foi considerado como o horário médio entre a última não-detecção de estro e a primeira detecção de estro; como fim do estro, o horário médio entre a última detecção de estro e a primeira não-detecção de estro; e como duração do estro, o tempo entre os dois horários médios citados anteriormente.

4.5 INSEMINAÇÃO E COBERTURA

No ensaio 1, as ovelhas foram inseminadas por via laparoscópica 55,05 horas ± 0,80 após a retirada da esponja. Elas foram mantidas em jejum hídrico e alimentar por 24 horas antes dos procedimentos. A inseminação foi precedida por sedação com acepromazina (0,05 mg/kg IV – Acepran®, Vetnil, São Paulo, Brasil), diazepam (0,2 mg/kg IV – Diazepam, Teuto®, Goiás, Brasil) e morfina (0,3 mg/kg IV – Dolo Moff®, São Paulo, Brasil). Os animais foram então colocados em macas inclinadas em decúbito dorsal. Após tricotomia e anti-sepsia da região abdominal caudal cranial ao úbere, e anestesia local (botões

anestésicos) com lidocaína 2%, dois trocáteres foram inseridos paralelamente a cada uma das veias epigástricas caudais superficiais, seguindo-se então a insuflação da cavidade abdominal com ar comprimido filtrado. Depois, foi introduzida uma óptica de 5 mm e 30º (óptica de laparoscopia, Karl Storz®, Alemanha) por uma das aberturas, e um conjunto de aplicador de sêmen com bainha e agulha 0,3 x 13mm pela outra abertura. A inseminação com sêmen descongelado (sêmen comercial), na dose de $20x10^6$, foi realizada via injeção através da parede do corno uterino (meia dose em cada corno), com deposição do sêmen na luz do útero. Após o procedimento foi aplicado, topicamente, unguento (Pearson®, Eurofarma, Rio de Janeiro, Brasil); sulfadiazina prata e cipermetrina (Bactrovet®, Konig, Argentina) e oxitetraciclina e hidrocortisona (Terracortril®, Pfizer, São Paulo, Brasil). Após as inseminações, foi realizado um repasse com carneiro, para elevar a heterospermia e aumentar as chances de prenhez.

4.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

No ensaio 1, trinta dias após a inseminação, foi realizada uma avaliação ultrassonográfica (SonoScape®, modelo S6V, Shenzhen, China) com sonda linear transretal de 7,5MHz, acoplada a uma guia de PVC, em todos os animais, para diagnóstico de gestação.

Foi mensurada a taxa de fertilidade aos 30 dias e a taxa de fertilidade dentre animais que apresentaram estro.

A gestação foi reconhecida através da visualização da vesícula aminiótica e detecção dos batimentos cardíacos do embrião.

4.7 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM DE PROGESTERONA

Nos dois ensaios, diariamente foi coletado sangue total dos animais experimentais para determinação das concentrações plasmáticas de progesterona. A coleta era realizada no período da manhã, anteriormente à avaliação ultrassonográfica, em tubos de coleta a vácuo (Vacutainer®) com EDTA, a partir da punção da veia jugular. As amostras eram imediatamente

resfriadas a 5°C, processadas para extração do plasma (centrifugação a 400 G por 15 minutos), e em seguida pipetadas para microtubos, etiquetadas e congeladas. A dosagem de progesterona foi realizada no Laboratório de Dosagem Hormonal localizado no Setor de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, através da técnica de radioimunoensaio. Foi utilizado kit comercial de radioimunoensaio (Immunotech/Beckman Coulter®, Praga, República Tcheca).

No ensaio 1, foi mensurada a concentração plasmática de progesterona de cada grupo ao longo do protocolo. A concentração plasmática de progesterona nos últimos seis dias antes e cinco dias após a retirada da esponja foi comparada entre os grupos, bem como no D0 de cada protocolo, no momento da aplicação da prostaglandina e do eCG, e no momento de retirada da esponja de MAP. Também foi comparada a concentração plasmática de progesterona entre os dias do protocolo, dentro de cada grupo. Animais com concentração plasmática de progesterona inferior a 1ng/ml nos cinco primeiros dias do experimento foram considerados em anestro. Foi mensurada e comparada entre os grupos a taxa de animais que se encontravam em anestro no início do experimento, a taxa de manifestação de estro e a taxa dos animais que ovularam dentre os animais que estavam em anestro. Também foi comparada a taxa de manifestação de estro e ovulação dos animais que estavam ciclando com os animais que estavam em anestro.

No ensaio 2, foi mensurada a concentração plasmática média de progesterona de todos os animais do experimento durante o protocolo, e também a concentração plasmática média de progesterona de animais em diestro no D0 (P4 > 1 ng/ml) e de animais em qualquer outra fase do ciclo estral no D0 (P4 < 1 ng/ml). Foi comparada a concentração plasmática de progesterona entre os dias do experimento considerando todos os animais, e também os dividindo em dois grupos: diestro no D0 e em outras fases do ciclo estral no D0. Foi comparada a concentração plasmática média de progesterona entre os animais em diestro no D0 e os animais em outras fases do ciclo estral no D0.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Bioestat® 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamiruá, Tefé, AM, Brasil, 2007).

No ensaio 1, os resultados das variáveis qualitativas – taxa de animais em anestro no início do experimento, taxa de manifestação de estro, taxa de fertilidade, taxa de ovulação e taxa de dupla ovulação – foram submetidos ao Teste exato de Fisher. Os resultados das variáveis quantitativas – diâmetro final do maior folículo, diâmetro final do segundo maior folículo, número médio de ovulações, duração do estro , intervalo da retirada da esponja ao início do estro, intervalo da retirada da esponja à ovulação, intervalo do início do estro à ovulação e concentração plasmática de progesterona no decorrer do tratamento – foram testados quanto à sua normalidade pelo Teste de Lilliefors. Em seguida, foram submetidos à ANOVA e ao Teste de Tukey, em sendo de distribuição normal; ou ao teste de Kruskal-Wallis e SNK, em caso de distribuição não-normal. A variação dos grupos foi analisada através do coeficiente de variação.

No ensaio 2, somente dados obtidos através da mesma metodologia foram comparados. As variáveis ddiâmetro final do maior folículo, diâmetro final do segundo maior folículo, intervalo da aplicação de prostaglandina à ovulação e intervalo do início do estro à ovulação, por contarem com mensuração diferente na primeira e na segunda aplicação (ultrassonografia uma vez ao dia x duas vezes ao dia) foram tratados apenas descritivamente.

Os resultados das variáveis qualitativas de taxa de manifestação de estro e taxa de ovulação foram submetidos ao Teste exato de Fisher. Os resultados das variáveis quantitativas de diâmetro final do maior folículo após 2ª aplicação, duração do estro, intervalo da aplicação de prostaglandina ao início do estro e concentração plasmática de progesterona foram testados quanto à sua normalidade pelo Teste de Lilliefors. Em seguida, foram submetidos à ANOVA, em caso de distribuição normal, ou ao teste de Kruskal-Wallis, em caso de distribuição não-normal.

O nível de significância adotado para as análises foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO 1

A taxa de animais que se encontravam em anestro no início do experimento foi de 28,1% (9/32). Em $G_{6\ dias}$ foi de 27,3% (3/11), em $G_{9\ dias}$ de 27,3% (3/11) e em $G_{12\ dias}$ de 30,0% (3/10) (P>0,05). Todos os animais considerados em anestro no início do experimento não apresentaram imagem sugestiva de corpo lúteo à ultrassonografia até o momento da retirada da esponja. Ao mesmo tempo, todos os animais considerados cíclicos no início do experimento apresentaram imagem de sugestiva de corpo lúteo até no máximo o quarto dia de protocolo.

Os resultados de manifestação de estro, ovulação e fertilidade são apresentados na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Variáveis reprodutivas qualitativas em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno.

Variável	**Grupos Experimentais**			
	$G_{6\ dias}$	**$G_{9\ dias}$**	**$G_{12\ dias}$**	**Total**
Percentagem de animais em estro	72,7% (8/11) [a]	72,7% (8/11) [a]	80% (8/10) [a]	75% (24/32)
Percentagem de animais que ovularam	81,8% (9/11) [a]	72,7% (8/11) [a]	90% (9/10) [a]	81,2% (26/32)
Percentagem de animais em estro (dentre animais em anestro no início do protocolo)	33,3% (1/3) [a]	66,7% (2/3) [a]	66,7% (2/3) [a]	55,5% (5/9)
Percentagem de animais que ovularam (dentre animais em anestro no início do protocolo)	66,7% (2/3) [a]	66,7% (2/3) [a]	100% (3/3) [a]	77,8% (7/9)
Taxa de gestação (30 dias)	45,5% (5/11) [a]	36,4% (4/11) [a]	20% (2/10) [a]	34,4% (11/32)

Números entre parênteses indicam o número de observações. Teste exato de Fisher (P>0,05).

Não houve diferença (P>0,05) entre a taxa de manifestação de estro dentre os animais em anestro no início do experimento (55,5% - 5/9) para os animais que estavam ciclando (82,6% - 19/23).

A taxa de ovulação dos animais que estavam ciclando no início do experimento (82,6% - 19/23) não diferiu (P>0,05) da taxa de ovulação dos animais em anestro no início do experimento (77,8% - 7/9).

Apenas um animal de $G_{6\ dias}$ e um animal de $G_{12\ dias}$ ovularam em até 84h sem ter apresentado estro; estes dois animais encontravam-se em anestro no início do experimento.

A taxa de gestação, considerando apenas os animais que entraram em estro, foi de 62,5% (5/8) para $G_{6\ dias}$, 50% (4/8) para $G_{9\ dias}$ e de 12,5% (1/8) para $G_{12\ dias}$. Não foi observada diferença entre $G_{6\ dias}$ e $G_{9\ dias}$ (P = 0,5), entre $G_{9\ dias}$ e $G_{12\ dias}$ (P = 0,141) e entre $G_{6\ dias}$ e $G_{12\ dias}$ (P = 0,059). Um dos animais que gestou em $G_{12\ dias}$ não manifestou estro.

Os resultados de duração do estro e intervalos da retirada da esponja ao início do estro, da retirada da esponja à ovulação e do início do estro à ovulação são apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Variáveis reprodutivas quantitativas de ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno (média ± desvio-padrão).

Variável	**Grupos experimentais**		
	$G_{6\ dias}$	**$G_{9\ dias}$**	**$G_{12\ dias}$**
Duração do estro (h)	39,0 ± 14,0 (8) [a] [12 – 60 h]	42,0 ± 12,8 (8) [a] [36 – 72 h]	42,0 ± 20,3 (8) [a] [12 – 72 h]
Intervalo da retirada da esponja ao início do estro (h)	46,0 ± 8,9 (8) [a] [29,5 – 53,5 h]	31,0 ± 7,7 (8) [b] [17,5 – 41,5 h]	32,5 ± 15,4 (8) [b] [17,5 – 65,5 h]
Intervalo da retirada da esponja à ovulação (h)	70,4 ± 10,9 (9) [a] [56,9 – 83,2 h]	58,7 ± 8,7 (8) [a] [44,1 – 70,9 h]	63,5 ± 12,5 (9) [a] [42,9 – 80,3 h]
Intervalo do início do estro à ovulação (h)	25,9 ± 6,1 (8) [a] [15,4 – 29,7 h]	27,7 ± 1,1 (8) [a] [26,5 – 29,4 h]	28,9 ± 10,5 (8) [a] [14,5 – 49,9 h]

Números entre parênteses indicam o número de observações. Números entre colchetes indicam amplitude das observações. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). Kruskal-Wallis e SNK.

O coeficiente de variação para a duração do estro foi de 35,85% para $G_{6\ dias}$, 30,54% para $G_{9\ dias}$ e 48,29% para $G_{12\ dias}$; para o intervalo da retirada da esponja ao início do estro foi de 19,41% para $G_{6\ dias}$, 24,81% para $G_{9\ dias}$ e 47,33% para $G_{12\ dias}$; para o intervalo da retirada da esponja à ovulação, foi de 15,49% para $G_{6\ dias}$, 14,76% para $G_{9\ dias}$ e 19,70% para $G_{12\ dias}$; e para o intervalo do início do estro à ovulação, foi de 23,67% para $G_{6\ dias}$, 4,15% para $G_{9\ dias}$ e 36,45% para $G_{12\ dias}$.

Os momentos da primeira detecção de estro e da primeira não-detecção do maior folículo têm suas distribuições apresentadas nas figuras 2 e 3.

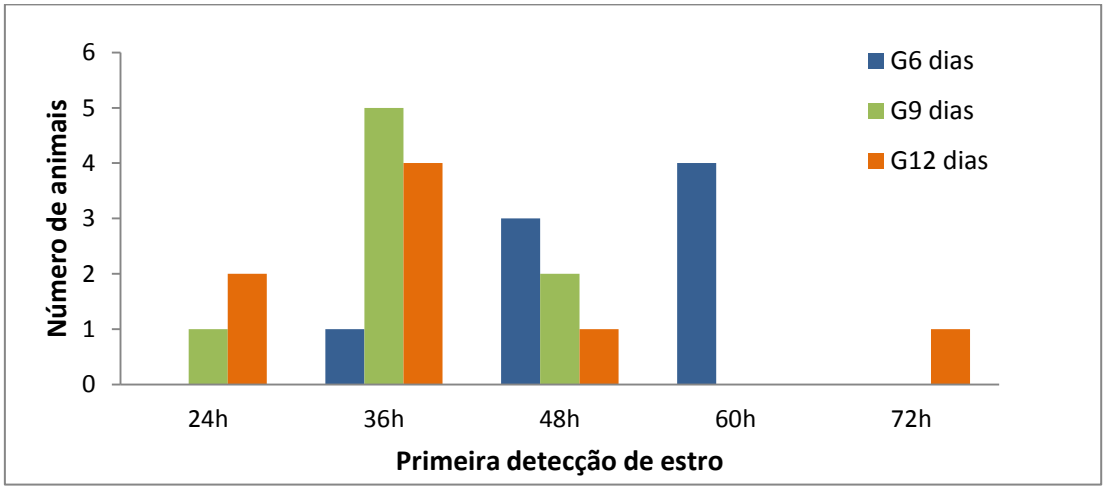

Figura 2. Distribuição do momento da primeira detecção de estro. Número de horas após a retirada da esponja.

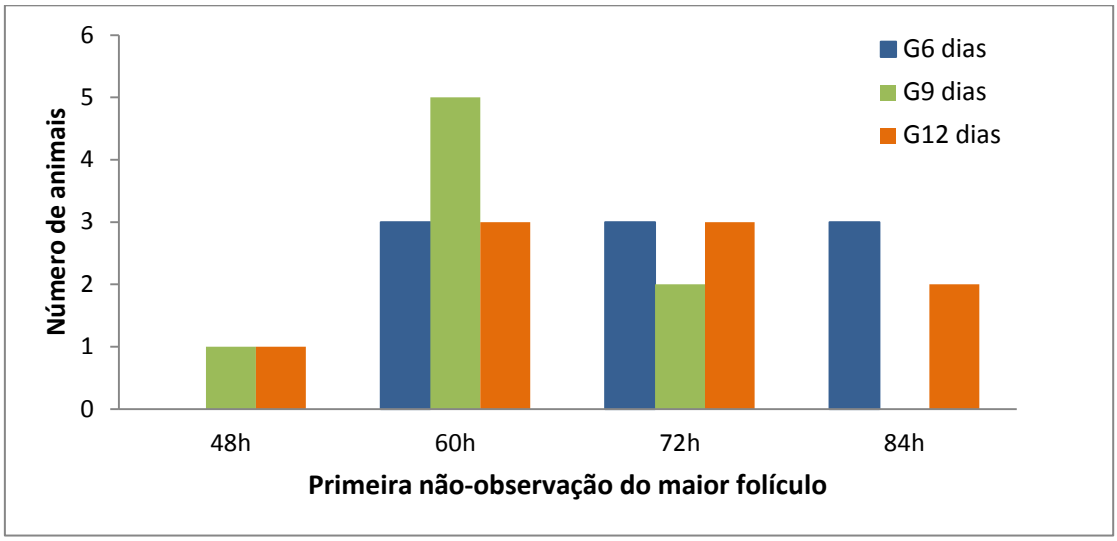

Figura 3. Distribuição do momento da primeira não-observação do maior folículo. Número de horas após a retirada da esponja.

Os resultados do diâmetro final do maior folículo e do segundo maior folículo, e o número médio de ovulações, são apresentados na tabela 1.3.

Tabela 1.3 Diâmetro final do maior folículo e do segundo maior folículo em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno (média ± desvio-padrão).

Variável	Grupos experimentais		
	$G_{6\ dias}$	**$G_{9\ dias}$**	**$G_{12\ dias}$**
Diâmetro final do maior Folículo (mm)	5,78 ± 0,45 [b] (9)	6,25 ± 0,65 [a] (8)	6,21 ± 0,28 [a] (9)
Diâmetro final do segundo maior Folículo (mm)	4,40 ± 0,89 [a] (4)	4,43 ± 0,90 [a] (7)	4,87 ± 1,18 [a] (6)
Número médio de ovulações	1,33 ± 0,50 [a] (9)	1,63 ± 0,52 [a] (8)	1,44 ± 0,53 [a] (9)

Números entre parênteses indicam o número de observações. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). Anova (diâmetro final do segundo maior folículo), Kruskal-Wallis e SNK.

As concentrações plasmáticas de progesterona ao longo do protocolo para cada tratamento são apresentadas nas figuras 4 e 5 e na tabela 1.4. Não houve diferença (P>0,05) nas concentrações plasmáticas de progesterona entre os

tratamentos nos últimos seis dias antes e cinco dias após a retirada da esponja. Também não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos quando comparados o D0, o dia da administração da prostaglandina e eCG, e o dia da retirada da esponja.

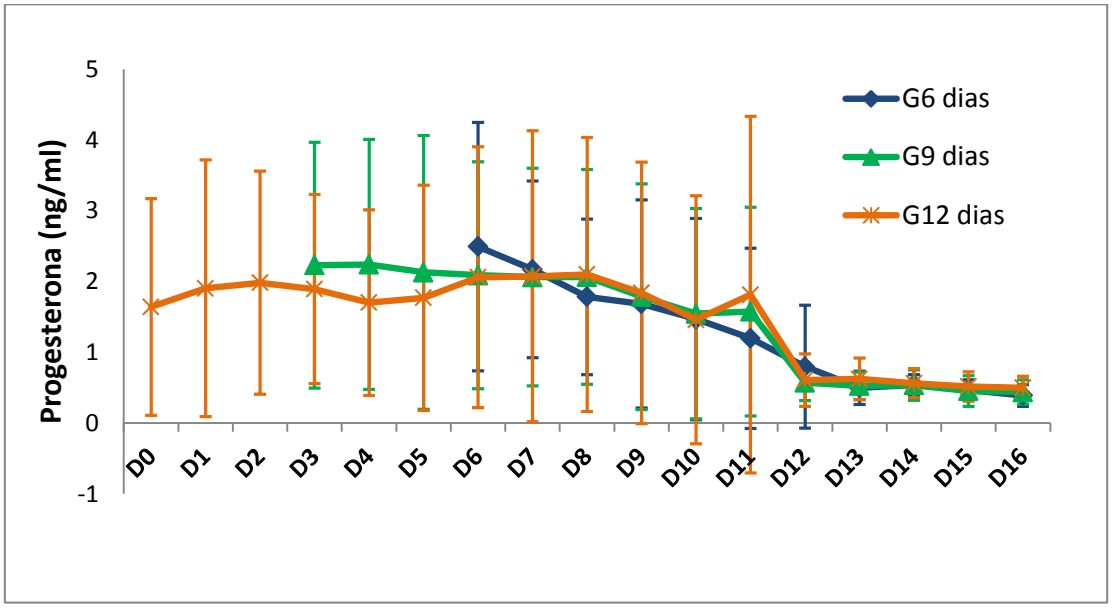

Figura 4. Concentração plasmática de progesterona ao longo do experimento. D11: eCG + PG. D12: retirada da esponja. Anova/Kruskal Wallis (P>0,05).

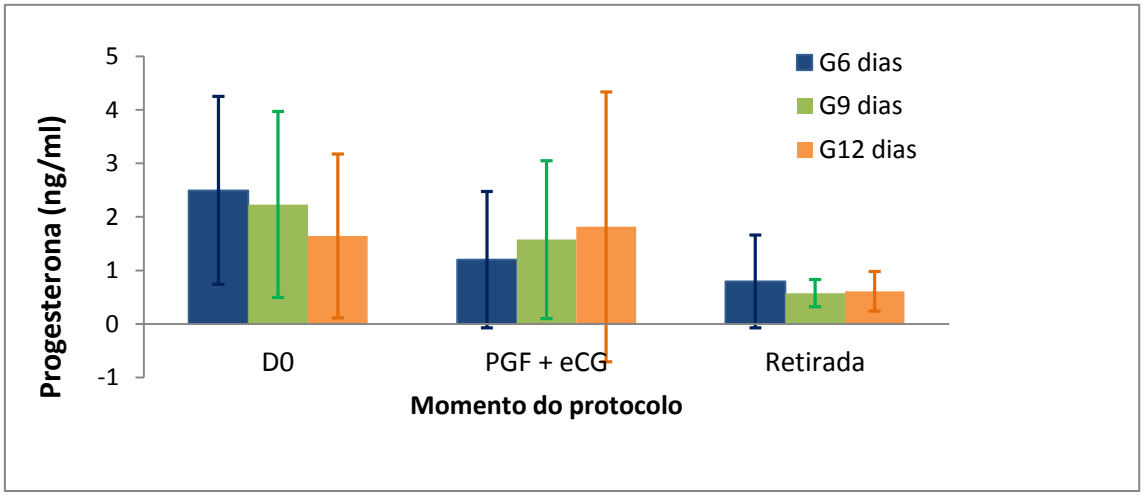

Figura 5. Concentração plasmática de progesterona no dia de início de cada protocolo (D0), no dia da aplicação de prostaglandina e eCG e no dia da retirada da esponja de MAP. ANOVA/Kruskal-Wallis (P>0,05).

Tabela 1.4 Concentração plasmática de progesterona (ng/ml) ao longo do experimento em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes tempos de permanência do progestágeno (média ±desvio-padrão).

Dia	Grupos experimentais		
	G 6 dias	**G 9 dias**	**G 12 dias**
D0	-	-	1,64 ± 1,53 (10) [a]
D1	-	-	1,90 ± 1,81 (10) [a]
D2	-	-	1,98 ± 1,57 (10) [a]
D3	-	2,23 ± 1,74 (11) [a,b]	1,89 ± 1,34 (10) [a]
D4	-	2,24 ± 1,77 (11) [a,b]	1,70 ± 1,31 (10) [a]
D5	-	2,13 ± 1,93 (11) [a,b]	1,77 ± 1,59 (10) [a]
D6	2,49 ± 1,76 (11) [a;A]	2,09 ± 1,60 (11) [a,b;A]	2,06 ± 1,84 (9) [a;A]
D7	2,17 ± 1,25 (11) [a; A]	2,06 ± 1,54 (11) [a,b;A]	2,07 ± 2,05 (10) [a;A]
D8	1,78 ± 1,10 (11) [a,b; A]	2,06 ± 1,52 (11) [a;A]	2,10 ± 1,94 (10) [a;A]
D9	1,68 ± 1,47 (11) [a,b; A]	1,78 ± 1,59 (11) [a,b;A]	1,84 ± 1,85 (10) [a;A]
D10	1,47 ± 1,42 (11) [a,b; A]	1,55 ± 1,48 (11) [a,b,c,d;A]	1,46 ± 1,75 (10) [a;A]
D11	1,20 ± 1,27 (11) [a,b,c;A]	1,57 ± 1,48 (11) [a,b,c;A]	1,81 ± 2,52 (10) [a;A]
D12	0,80 ± 0,87 (11) [b,c;A]	0,57 ± 0,25 (11) [a,b,c,d;A]	0,61 ± 0,37 (10) [a;A]
D13	0,50 ± 0,24 (11) [b,c;A]	0,53 ± 0,19 (11) [b,c,d;A]	0,62 ± 0,29 (10) [a;A]
D14	0,54 ± 0,14 (11) [a,b,c;A]	0,53 ± 0,21 (11) [b,c,d;A]	0,56 ± 0,20 (10) [a;A]
D15	0,47 ± 0,15 (11) [b,c;A]	0,45 ± 0,22 (11) [d;A]	0,52 ± 0,21 (10) [a;A]
D16	0,39 ± 0,15 (11) [c;A]	0,44 ± 0,17 (11) [c,d;A]	0,50 ± 0,16 (10) [a;A]

Números entre parênteses indicam o número de observações. PG : prostaglandina. D11: aplicação de eCG e PG. D12: retirada da esponja.Letras maiúsculas na mesma linha: comparação entre tratamentos. (P>0,05; ANOVA/Kruskal-Wallis) Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05; Kruskal-Wallis e SNK).

5.2 ENSAIO 2

Dois animais foram retirados das avaliações ultrassonográficas, devido ao posicionamento profundo do conjunto útero-ovários e à qualidade ruim da imagem gerada. No entanto, estes animais permaneceram para a rufiação e os dados relacionados ao estro foram utilizados.

Os resultados de manifestação de estro e ovulação são apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1 Taxas de manifestação de estro e de ovulação em ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização de estro com duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias.

Variável	**Aplicação de PGF2α**	
	1ª aplicação	**2ª aplicação**
Percentagem de animais em estro	78,3% (18/23)[b]	100% (23/23)[a]
Percentagem de animais que ovularam	85,7% (18/21) [a]	100% (21/21) [a]

Números entre parênteses indicam o número de observações. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). Teste exato de Fisher.

Dos dezoito animais que apresentaram estro após a primeira aplicação, três já se encontravam em estro na primeira sessão de rufiação (24 horas após a primeira aplicação) e não puderam ter o momento de início do estro determinado.

Os resultados de duração do estro e de intervalo da aplicação de prostaglandina ao início do estro são apresentados na tabela 2.2.

Tabela 2.2 Duração do estro e intervalo da aplicação ao início do estro em ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização de estro com duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias (média ± desvio-padrão).

Variável	**Aplicação de PGF2α**	
	1ª aplicação	**2ª aplicação**
Duração do estro (h)	34,4 ± 7,7 (15) [24 – 48 h]	39,1 ± 10,4 (23) [24 – 60 h]
Intervalo da aplicação ao início do estro (h)	39,5 ± 10,6 (15) [26,75 – 50,75 h]	36,1 ± 9,5 (23) [26,75 – 50,75 h]

Números entre parênteses indicam o número de observações. Números entre colchetes indicam amplitude das observações. Kruskal-Wallis (P>0,05).

Os resultados dos intervalos da aplicação à ovulação, do início do estro à ovulação e de diâmetro folicular são apresentados na tabela 2.3.

Tabela 2.3 Intervalos da aplicação da prostaglandina à ovulação, do início do estro à ovulação e diâmetros foliculares em ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização de estro com duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias (média ± desvio padrão).

Variável	**Aplicação de PGF2α**	
	1ª aplicação	**2ª aplicação**
Intervalo da aplicação à ovulação (h)	66,9 ± 24,4 (18) [58,84 – 85,20 h]	69,6 ± 7,8 (21) [53,14 – 87,65 h]
Intervalo do início do estro à ovulação (h)	39,0 ± 8,3 (15) [32,09 – 58,45 h]	33,1 ± 7,3 (21) [25,68 – 50,69 h]
Diâmetro do maior Folículo (mm)	5,93 ± 0,7 (18)	6,33 ± 0,51 (21)
Diâmetro do segundo maior folículo (mm)	4,64 ± 0,8 (16)	4,73 ± 0,9 (20)

Números entre parênteses indicam o número de observações. Números entre colchetes indicam amplitude das observações.

O diâmetro final do maior folículo após a segunda dose nos animais que estavam em diestro no D0 foi de 6,38 mm ± 0,32, enquanto nos animais que estavam em outras fases do ciclo estral no D0 foi de 6,27 mm ± 0,70. (P>0,05; Anova).

As concentrações plasmáticas de progesterona ao longo do protocolo são demonstradas na figura 6 e na tabela 2.4.

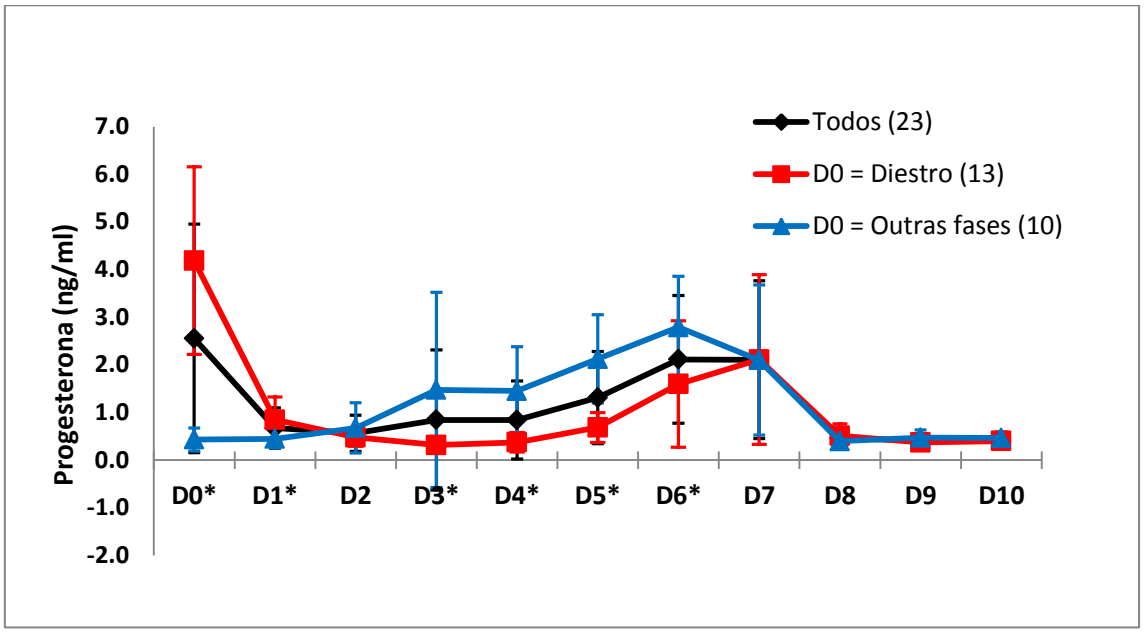

Figura 6. Concentração plasmática de progesterona ao longo do experimento em todos os animais, nos animais em diestro no D0, e nos animais em outras fases do ciclo estral no D0. Números entre parênteses indicam número de observações. D0 e D7: aplicação de prostaglandina.Dias com asterisco: diferença (P<0,05) entre animais em diestro no D0 e animais em outras fases do ciclo estral no D0. ANOVA/Kruskal-Wallis.

Tabela 2.4 Concentrações plasmática de progesterona ao longo do experimento em todos os animais, nos animais em diestro no D0 e dos animais em outras fases do ciclo estral no D0 (média ±desvio padrão).

Dia do Protocolo	FASE DO CICLO ESTRAL NO D0			
	Diestro	**(P4 > 1ng/ml)**	**Outras fases (P4 < 1ng/ml)**	**Todos os animais**
D0	4,19	± 1,97 (13) [a; A]	0,43 ± 0,24 (10) [d; B]	2,55 ± 2,40 (23) [a]
D1	0,85	± 0,48 (13) [b,c; A]	0,45 ± 0,19 (10) [c,d; B]	0,67 ± 0,42 (23) [b]
D2	0,48	± 0,19 (13) [c,d; A]	0,68 ± 0,53 (10) [c,d; A]	0,56 ± 0,38 (23) [b,c]
D3	0,31	± 0,15 (12) [d; B]	1,47 ± 2,05 (10) [b,c; A]	0,84 ± 1,47 (22) [b,c]
D4	0,37	± 0,20 (13) [d; B]	1,45 ± 0,93 (10) [a,b; A]	0,84 ± 0,82 (23) [b,c]
D5	0,68	± 0,31 (13) [c; B]	2,12 ± 0,92 (10) [a,b; A]	1,31 ± 0,97 (23) [a]
D6	1,59	± 1,33 (13) [a,b; B]	2,79 ± 1,07 (10) [a; A]	2,11 ± 1,34 (23) [a]
D7	2,11	± 1,78 (13) [a,b; A]	2,10 ± 1,57 (10) [a,b; A]	2,11 ± 1,66 (23) [a]
D8	0,51	± 0,25 (13) [c,d; A]	0,40 ± 0,10 (10) [d; A]	0,46 ± 0,20 (23) [b,c]
D9	0,37	± 0,11 (13) [d; A]	0,47 ± 0,16 (10) [c,d; A]	0,41 ± 0,14 (23) [c]
D10	0,40	± 0,11 (12) [d; A]	0,46 ± 0,12 (10) [c,d; A]	0,43 ± 0,12 (22) [b,c]

Números entre parênteses indicam o número de observações. D0 e D7: aplicação de prostaglandina. Letras minúsculas diferentes indicam diferença na mesma coluna (P<0,05). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre animais em diestro no D0 e animais em outras fases do ciclo estral no D0. Anova/Kruskal-Wallis e SNK.

Todos os animais apresentaram concentração plasmática de progesterona maior que 1 ng/ml em pelo menos um dia do experimento. Houve diferença (P<0,05) na concentração plasmática de progesterona entre os animais em diestro no D0 e os animais em outras fases do ciclo estral no D0 em: D0; D1; D3; D4; D5; e D6. Os animais em diestro no D0 exibiram maior concentração de progesterona em D0 e D1, enquanto os animais em outras fases do ciclo

estral no D0 exibiram maior concentração plasmática de progesterona em D3, D4, D5 e D6.

6. DISCUSSÃO

6.1. ENSAIO 1

A estacionalidade reprodutiva observada neste trabalho (28,1% de animais em anestro no início do experimento) é compatível com a encontrada por Balaro et al. (2014) em fêmeas da raça Santa Inês no sudeste brasileiro. Balaro et al. (2014), coletando sangue de animais para dosagem de progesterona a cada quinze dias, durante um ano, encontraram 70% de animais que apresentaram anestro em algum período do ano, com 85,7% dos períodos de anestro ocorrendo durante a primavera (setembro a dezembro), mesma época do ano em que o presente estudo foi realizado.

A ultrassonografia em modo B coincidiu com a dosagem de progesterona plasmática para a determinação de ciclicidade dos animais no início do experimento. Assim, pode-se afirmar que a ultrassonografia em modo B, para observação da presença ou ausência de corpo lúteo, é um meio eficaz para determinação de ciclicidade em ovinos. No entanto, deve-se atentar para a possibilidade de um animal cíclico se encontrar em fase do ciclo estral desfavorável à visualização desta estrutura. A determinação de ciclicidade através da visualização de estrutura luteal se torna difícil no período posterior à luteólise até a fase de luteinização inicial. Assim, avaliações ultrassonográficas sequenciais, com intervalos que considerem este período, podem ser recomendadas para a determinação de ciclicidade em ovinos.

Não houve diferença entre os grupos em relação à taxa de manifestação de estro. Os três tratamentos foram eficientes em sincronizar o estro dos animais, embora alcançando taxas um pouco inferiores às encontradas por outros autores (Ungerfield & Rubianes, 1999; Santos et al., 2010; Silva et al., 2010).

Apenas dois animais que ovularam não apresentaram estro (cio silencioso), sendo que estes dois animais se encontravam em anestro no início do experimento (um em $G_{6\ dias}$ e outro em $G_{12\ dias}$). Isto poderia ser explicado pela ausência de uma prévia sensibilização do sistema nervoso central pela progesterona, provavelmente por um período de anestro prolongado anterior ao

experimento. É bem descrito na literatura a necessidade de uma prévia exposição à progesterona para que ocorra a manifestação de estro em resposta ao aumento das concentrações circulantes de estradiol produzidas pelo folículo pré-ovulatório (Bartlewski et al., 2011). Acredita-se desta forma que o tratamento com MAP foi incapaz de pré-sensibilizar o sistema nervoso central destes animais para a manifestação de estro. O tempo de permanência do implante, mais curto que uma fase luteal normal, e com a possibilidade de apresentar queda para valores subluteais após 6 dias (Rubianes & Menchaca, 2003; Levya et al., 1998), no caso de tratamentos com tempo de permanência mais longo, é uma possível explicação.

A taxa de ovulação não diferiu entre os grupos, sendo possível afirmar que os três tratamentos foram igualmente eficientes em promover ovulação em ovelhas submetidas à sincronização de estro. A taxa de ovulação foi ligeiramente inferior à de alguns trabalhos (Silva et al., 2010), embora similar à de outros (Dias et al., 2001) que também utilizaram ovelhas deslanadas.

A taxa de ovulação não diferiu entre os animais que estavam em anestro no início do experimento e os animais que estavam ciclando. Os três tratamentos foram igualmente eficientes em promover ovulação em animais que se encontravam em anestro, o que pode ser explicado pela utilização de eCG, que forneceu um aporte de gonadotrofinas necessárias para o desenvolvimento folicular final (Fonseca, 2005), e pela própria utilização do implante de progestágeno, que proporciona ambiente hormonal favorável para o desenvolvimento folicular, ainda que em um contexto de baixas concentrações de progesterona endógena (Levya et al., 1998; Wiltbank et al., 2011).

Apesar de não ter sido observada diferença entre os protocolos em relação à taxa de ovulação, sendo os três considerados igualmente eficientes em promover ovulação, nota-se que $G_{9\ dias}$ apresentou menor dispersão do intervalo da retirada da esponja à ovulação e do intervalo do início do estro à ovulação em relação aos demais grupos. O coeficiente de variação de G9 dias para estas duas variáveis foi o único dentre os três grupos a ficar abaixo de 15%, sendo observada uma variabilidade mínima no intervalo do início do estro à ovulação (4,15%).

Ao se considerar o uso de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sem dúvida o protocolo de nove dias de MAP se destaca frente aos demais, já que nesta biotécnica é extremamente desejável que a ovulação ocorra dentro de uma faixa de variação mínima. Em programas onde a inseminação dos animais é realizada somente após detecção de estro, o protocolo de nove dias de MAP permitiria inseminação apoiada numa grande concentração de ovulações em um curto intervalo de tempo. Desta forma, em relação ao manejo reprodutivo, o protocolo de nove dias se mostrou o mais indicado para programas de IATF e inseminação após detecção de cio.

O maior intervalo da retirada do implante ao início do estro observado em $G_{6\ dias}$, em comparação a $G_{9\ dias}$ e $G_{12\ dias}$, está diretamente relacionado ao menor diâmetro folicular final encontrado em $G_{6\ dias}$. Estes dois achados podem ser explicados a partir das concentrações de progesterona às quais os animais foram expostos durante os tratamentos. Levya et al. (1998) afirmam que uma maior concentração plasmática de progesterona promove maior turnover folicular, encurtando a duração de uma onda folicular e favorecendo o recrutamento de uma nova onda. Altas concentrações de progesterona reduzem a pulsatilidade de LH, apressando a atresia folicular pelo baixo aporte desta gonadotrofina para o crescimento folicular final, e ao mesmo tempo aumenta a liberação de isoformas mais glicosiladas de FSH, favorecendo que este hormônio alcance o limiar necessário para promover a emergência de uma nova onda (Bartlewski et al., 2011). Apesar de as concentrações plasmáticas de progesterona endógena não terem apresentado diferença entre os tratamentos, Rubianes & Menchaca (2003) afirmam que em caprinos, após seis dias de permanência do implante progestágeno, as concentrações plasmáticas de progesterona promovidas pelo implante caem para valores subluteais, assim como sugere Levya et al. (1998). Aliado a isto, Levya et al (1998) observaram que folículos submetidos à uma combinação de progesterona endógena e exógena apresentaram diâmetro menor que folículos submetidos a progesterona endógena ou exógena somente.

Desta forma, um protocolo curto, cujos animais têm maior chance de exposição simultânea a uma combinação de progesterona endógena e exógena, e não são submetidos a concentrações subluteais de progesterona provocadas por um implante de progestágeno com mais de seis dias de

permanência, promove uma maior concentração de progesterona plasmática, o que determina maior turnover folicular, justificando o menor diâmetro à ovulação. Folículos submetidos a baixas concentrações de progesterona plasmática, em virtude de baixa concentração de progesterona endógena (devido à luteólise natural ou à luteólise precoce, já que a regressão luteal pode ocorrer mais cedo quando se utiliza implantes progestágenos – Levya et al., 1998), pela baixa concentração de progesterona exógena após seis dias de permanência do implante, ou pela combinação de ambos, apresentam maior diâmetro e maior persistência que aqueles submetidos à um ambiente de altas concentrações de progesterona. Este fenômeno pode ser explicado por uma pulsatilidade de LH aumentada em virtude da menor concentração de progesterona plasmática, o que favorece a persistência folicular e resulta em maiores diâmetros alcançados ao final do protocolo.

Observa-se, portanto, que um ambiente hormonal de maior concentração de progesterona durante o período de desenvolvimento folicular do protocolo, por promover maior turnover folicular, resulta em menores diâmetros foliculares e em maior tempo necessário, após a retirada do implante, para que o folículo atinja produção de estrógeno suficiente para que ocorra manifestação de estro, como ocorreu em $G_{6\ dias}$. Ao mesmo tempo, protocolos em que os animais possam ser submetidos a baixas concentrações de progesterona, como acontece em protocolos longos, resulta em maiores diâmetros foliculares e em um grau de maturação folicular mais avançada ao final do tratamento, o que diminui o tempo necessário para que o folículo alcance produção de estrógeno capaz de promover o comportamento estral. Isto pode ser observado em $G_{9\ dias}$ e em $G_{12\ dias}$ quando comparados a $G_{6\ dias}$.

Ambiente hormonal de baixa progesterona e pulsatilidade de LH aumentada, durante o período de desenvolvimento folicular do protocolo de sincronização de estro, além de gerar persistência folicular e maior diâmetro folicular, prejudica a qualidade do oócito, por promover descompasso entre a maturação nuclear e a citoplasmática (Letelier et al., 2009; Viñoles et al., 1999). Wiltbank et al. (2011) aponta o maior tempo de exposição ao LH e o aumento da pulsatilidade desta gonadotrofina, ambos em virtude da baixa progesterona, como responsáveis pela pior qualidade do oócito em folículos que se desenvolveram sob tal ambiente hormonal. Um ambiente hormonal ideal para a

etapa de desenvolvimento folicular de um protocolo de sincronização de estro seria proporcionado por altas concentrações de progesterona, aumentando o turnover folicular e proporcionando sempre, ao final do protocolo, um folículo de tamanho não exagerado e não envelhecido que seria capaz de apresentar melhor fertilidade. À luz da literatura, os resultados obtidos sugerem que o protocolo de seis dias de MAP é capaz de promover ambiente hormonal mais adequado em relação ao de nove e ao de doze dias, o que é compatível com o menor diâmetro folicular final e com o maior tempo necessário para manifestação de estro observados em $G_{6\ dias}$.

A taxa de gestação não diferiu entre os tratamentos, sendo observadas taxas inferiores a de outros estudos que utilizaram protocolos de sincronização de estro baseados em implantes de MAP. Santos et al. (2010), na região sul do Brasil, observaram em ovelhas Texel uma taxa de fertilidade de 86% após sincronização com MAP 60 mg por 9 dias com 400 UI de eCG no dia da remoção do implante e inseminação intracervical com sêmen fresco após detecção de estro. Cavalcanti (2008) obteve no sudeste brasileiro, utilizando animais Santa Inês e mestiços Santa Inês/Dorper em um protocolo de MAP 60 mg por 6 dias com 300 UI de eCG e prostaglandina um dia antes da retirada do dispositivo, uma taxa de fertilidade de 65% no grupo que utilizou monta natural.

No entanto, nestes estudos citados, bem como na maior parte dos estudos de fertilidade de protocolos de sincronização de estro em ovinos, os animais não foram submetidos a sessões ultrassonográficas diárias e/ou a cada doze horas, como no presente trabalho. Cavalcanti (2008), no mesmo trabalho e com o mesmo protocolo, mas utilizando inseminação artificial por via laparoscópica em animais que foram submetidos a sessões ultrassonográficas diárias, observou uma taxa de gestação de 40%, similar à de $G_{6\ dias}$ e de $G_{9\ dias}$ no presente estudo. Animais submetidos a condições estressantes prolongadas, como pode ter ocorrido no presente estudo devido à intensa manipulação uma e/ou duas vezes ao dia para a coleta de sangue e sessões ultrassonográficas, têm a secreção de cortisol pelas glândulas adrenais aumentadas, o que sabidamente afeta o padrão de secreção de gonadotrofinas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário em ruminantes (Dobson et al., 2000).

6.2. ENSAIO 2

A taxa de manifestação de estro após a primeira aplicação de prostaglandina é compatível com os dados da encontrados na literatura. Acritopolou & Haresign (1980) observaram 66,6% das ovelhas em estro após a primeira dose de prostaglandina. A manifestação de estro após a primeira aplicação de prostaglandina depende da fase do ciclo estral em que o animal se encontra no momento da aplicação da primeira dose (Deaver et al., 1986). Caso um corpo lúteo responsivo à prostaglandina esteja presente, ocorrerá luteólise, aumento da pulsatilidade de LH, desenvolvimento folicular, pico pré-ovulatório de LH e ovulação. Se não houver corpo lúteo responsivo à prostaglandina no momento da primeira aplicação, como por exemplo, em animais entre o dia 15 e 2 do ciclo estral (proestro, estro e início do metaestro), uma nova aplicação em um intervalo de tempo determinado será necessária para sincronizar o estro.

A taxa de manifestação de estro após a segunda dose de prostaglandina foi de 100%, idêntica à encontrada por Silva et al. (2010), utilizando um protocolo de sincronização com duas doses de 0,530 mg de d-cloprostenol com um intervalo de 9 dias, e superior à encontrada por Acritopolou et al. (1982), que utilizou duas doses intervaladas de 9 dias encontrando 95% de manifestação de estro. A resposta a um protocolo de sincronização de estro baseado na aplicação intervalada de prostaglandina é dependente da presença de corpo lúteo nos ovários do animal, ou seja, existe a necessidade de que o animal esteja ciclando. A época do ano em que o experimento foi executado (mês de maio), durante a estação reprodutiva de ovinos no hemisfério sul, somado à disponibilidade de forragem de boa qualidade nutricional, refletido pela condição corporal, no período do experimento, foram fatores que contribuíram para a máxima taxa de sincronização alcançada (Balaro et al., 2014).

A manifestação de estro após a segunda dose de prostaglandina é dependente da presença de um corpo lúteo responsivo no momento de aplicação. Para que ela ocorra, portanto, deve ser dado um intervalo suficiente para que os animais que sofreram luteólise após a primeira aplicação

desenvolvam um novo corpo lúteo e que este se torne responsivo à prostaglandina, e para que os animais que não se encontravam na fase luteal no momento da primeira aplicação, seja por ovulação recente ou por se encontrarem em proestro, desenvolvam um corpo lúteo responsivo à segunda aplicação. Analisando a taxa de manifestação de estro após a segunda aplicação, pode-se concluir que o intervalo de sete dias entre a primeira e a segunda aplicação é tempo suficiente para que haja um corpo lúteo responsivo após a segunda dose de prostaglandina, permitindo máxima sincronização.

Todos os animais que ovularam apresentaram estro anterior à ovulação (ausência de cio silencioso). A maior percentagem observada na taxa de ovulação após a primeira aplicação em relação à taxa de manifestação de estro após a primeira aplicação se deve à retirada de dois animais das sessões ultrassonográficas. O fato de todos os animais estarem ciclando durante o período do experimento, corroborado pela dosagem de progesterona e pela taxa de manifestação de estro após a segunda aplicação, pode ter contribuído para a ausência de cio silencioso. Neste caso, todos os animais se encontrariam pré-sensibilizados pela progesterona e, portanto, aptos a manifestar comportamento estral frente a elevações nas concentrações plasmáticas de estradiol (Bartlewski et al., 2011).

O intervalo da segunda aplicação ao início do estro observado foi mais curto que o encontrado por alguns autores, como Silva et al. (2010), que encontraram um intervalo de 66,0 horas em um protocolo de 9 dias, e como Godfrey et al. (1997), que observaram um intervalo de 69,6 horas em um protocolo de 10 dias. No entanto, este intervalo foi similar à de outros autores, como Rubianes et al. (2003) em um protocolo de 7 dias, onde obtiveram um intervalo de 40,6 horas, e como Godfrey et al (2000), que observaram um intervalo de 31,6 horas, em um protocolo de 10 dias entre uma aplicação e outra. Como Silva et al. (2010) apontam em seu estudo, estes contrastes podem ser devidos à fase de desenvolvimento folicular presente no momento da aplicação de prostaglandina. Caso um folículo pré-ovulatório esteja presente em um dos ovários no momento da aplicação, o intervalo entre aplicação e estro seria menor; mas se nenhum folículo de tamanho pré-ovulatório estiver presente, mais tempo seria necessário para que se alcançasse produção de estrógeno suficiente para desencadear comportamento estral. Vale lembrar que

nestes protocolos não foram utilizadas gonadotrofinas exógenas nem indutores de ovulação, que poderiam uniformizar o intervalo entre a aplicação de prostaglandina e o início do estro. Como se pode prever, no entanto, esta variação encontrada entre estudos nos intervalos entre a aplicação de prostaglandinas e o estro se reflete nos intervalos entre a aplicação de prostaglandina e a ovulação, o que gera um obstáculo potencial para adoção da inseminação artificial em tempo fixo.

O intervalo da segunda aplicação à ovulação foi similar ao encontrado por Rubianes et al (2003), de 60,8 após um protocolo com intervalo de 7 dias. O elevado desvio-padrão observado para o intervalo da primeira aplicação à ovulação pode ser atribuído a ovulações precoces após a primeira aplicação de prostaglandina. Na verdade, no momento da primeira aplicação de prostaglandina em um lote de animais cíclicos, alguns podem ser encontrados em proestro ou mesmo em estro, como foi observado neste experimento, o que reduz o intervalo para a ovulação após a primeira aplicação e gera uma grande dispersão no momento da ovulação após a administração do agente luetolítico. Obviamente, este fato impossibilita inseminação em tempo fixo após uma única dose de prostaglandina.

Como a taxa de dupla ovulação e o diâmetro do 2° maior folículo foram baseados em tamanhos mínimos do segundo maior folículo para que fossem considerados, podem ter sofrido viés devido à frequência das avaliações ultrassonográficas, uma vez ao dia após a primeira prostaglandina e duas vezes ao dia após a segunda aplicação. Por exemplo, um folículo subordinado, em processo de regressão, pode não ter sido registrado com um diâmetro menor que o limite imposto no estudo no momento de ovulação, o que termina por elevar a taxa de ovulação da primeira aplicação em relação à segunda.

O diâmetro final do maior folículo após a segunda aplicação de prostaglandina foi semelhante à de outros trabalhos que utilizaram outros protocolos, como o de Cavalcanti (2008) trabalhando com protocolo de MAP por 6 dias e 300 UI de eCG mais prostaglandina um dia antes da retirada do implante, que encontrou um diâmetro final de 6,4 mm. Também foi similar aos diâmetros observados no Ensaio 1 do presente trabalho, principalmente em

relação aos protocolos $G_{9\ dias}$ e $G_{12\ dias}$, mas apresentando diâmetro sensivelmente maior em relação ao encontrado em $G_{6\ dias}$.

A flutuação das concentrações plasmáticas de progesterona ao longo do protocolo é similar à encontrada por Fierro et al. (2011). Pode-se observar que os animais em diestro no D0 são submetidos a um ambiente hormonal de baixa progesterona durante a fase de desenvolvimento folicular anterior à segunda aplicação de prostaglandina, em virtude da luteólise provocada pela primeira aplicação. Estes animais demonstraram concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 1 ng/ml durante cinco dos seis dias anteriores à segunda aplicação de prostaglandina. Já os animais em outras fases do ciclo estral no D0 (baixa progesterona no D0) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase de desenvolvimento folicular anterior à segunda aplicação, obtendo maiores valores em D1 e em quatro dos cinco dias anteriores à segunda dose. Como estavam ciclando, a baixa concentração de progesterona no D0 se explica pela fase do ciclo estral em que se encontravam no momento da primeira aplicação (proestro, estro, metaestro). Durante o protocolo, houve formação de corpo lúteo capaz de manter as concentrações plasmáticas de progesterona em níveis luteais.

Bartlewski et al (2011) comentam que no ciclo estral natural a primeira onda folicular após a luteólise se desenvolve sob um ambiente de baixas concentrações de progesterona, o que determina desenvolvimento folicular prolongado, além de maiores diâmetros alcançados pelo folículo pré-ovulatório desta onda em relação aos de ondas que emergem durante o diestro. Desse modo, em um protocolo de dupla aplicação de prostaglandina com sete dias de intervalo, temos um grupo de animais que serão submetidos a concentrações subluteais de progesterona durante a fase de desenvolvimento folicular (os animais que estavam em diestro no D0), e um grupo de animais em que o desenvolvimento folicular será, naturalmente, em um ambiente de concentração de progesterona plasmática que propicia persistência folicular prolongada, como ocorre com a primeira onda folicular pós-ovulação (os animais em outras fases do ciclo estral no D0).

Estes dados ajudam a explicar as baixas taxas de fertilidade observadas em protocolos de sincronização de dupla aplicação de prostaglandinas em

intervalos curtos, quando comparados a protocolos com intervalos maiores entre as aplicações, e a protocolos de MAP e eCG. Olivera-Muzante et al. (2011) encontraram 26% de fertilidade para um protocolo de dupla prostaglandina com 7 dias de intervalo, observando 48% de fertilidade para um protocolo controle de MAP 60 mg por 13 dias mais 300 UI de eCG, ambos após inseminação intracervical com sêmen fresco 54 horas após o fim do protocolo. Neste estudo, Olivera-Muzante et al. (2011) concluem que, independente da via de inseminação, tipo de sêmen e tempo para inseminação em tempo fixo, o protocolo de dupla prostaglandina com sete dias de intervalo produziu resultados piores que o protocolo controle de MAP e eCG. Fairnie et al.(1977) apontam que a redução do intervalo entre as aplicações de 14 para 8 dias produziu taxas de fertilidade menores. Fierro et al (2011) comentam que encurtar o intervalo entre as aplicações de prostaglandina diminui a extensão da fase luteal, o que altera as concentrações e o perfil de progesterona anterior à ovulação provocada pelo protocolo.

Como já explicado anteriormente, um ambiente hormonal de baixa progesterona leva à elevação da pulsatilidade de LH durante o desenvolvimento folicular, o que ocasiona em persistência folicular, diâmetro folicular aumentado, envelhecimento do oócito, resultando em pior fertilidade potencial.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- O uso de implante intravaginal de 60 mg de MAP por nove dias promove menor dispersão do momento de ovulação que o uso por seis ou doze dias, o que torna este protocolo mais apropriado para IATF e inseminação após detecção de cio.

- O protocolo de duas doses de prostaglandina com intervalo de sete dias, apesar de sincronizar o estro de forma eficiente, resulta em desenvolvimento folicular sob baixas concentrações de progesterona.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. Animal Reproduction Science 130, 173– 179. 2012.

Acritopoulou S., Haresign W. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2a given at different stages of the oestrous cycle. J Reprod Fertil;58:219–23.1980.

Acritopoulou-Fourcroy S., Papas V., Peclaris G., Zervas N. Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2a or the prostaglandin analogue, ICI80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. Rep Nut Dev;22:345–54. 1982.

Baird, D.T., Pulsatile secretion of LH and ovarian oestradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. Biol. Reprod. 18, 359–364. 1978.

Balaro, M.F.A., Fonseca, J.F., Oba, E., Cardoso, E.C., Brandão, F.Z. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? Trop. Anim. Health Prod. published online 25 september 2014.

Baril, G.; Remy, B.; Leboeuf, B.; Beckers, J. F.; Saumande, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination, Theriogenology, 45, 1553-1559. 1996.

Bartlewski, P.M., Baby, T.E., Giffin, J.L. Reproductive cycles in sheep. Animal Reproduction Science 124, 259–268. 2011.

Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Rawlings, N.C., An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. Theriogenology 52, 115–130. 1999a.

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. J. Reprod. Fertil. 115, 111–124. 1999b.

Bigelow, K.L., Fortune, J.E. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. Biol Reprod. 58,1241–9. 1998.

Bretzlaff, K.N., Romano, J.E., Advanced reproductive techniques in goats. Vet. Clin. North Am. Food Anim.Pract. 17, 421–434. 2001.

Cahill, L.P., Mauleon, P., Influences of season, cycle and breed on the follicular growth rates in sheep. J. Reprod. Fertil. 58, 321–328. 1980.

Cavalcanti, A.S. Avaliação do uso do GnRH em protocolos curtos de indução e sincronização do estro e da ovulação em ovelhas. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. p 54) Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2008.

Corteel, J.M., Leboeuf, B., Baril, G., Artificial breeding of goats and kids induced to ovulate with hormonsoutside the breeding season. Small Rumin. Res. 1, 19–35. 1988.

Das G.K., Naqvi S.M.K., Gulyani R., Joshi A., Mittal J.P. Effect of two protocols of PGF2a treatment for synchronization of estrus in a tropical sheep [Abstract]. Theriogenology;51(1):283. 1999.

Deaver D.R., Stilley N.J., Dailey R.A., Inskeep E.K., Lewis P.E. Concentrations of ovarian and pituitary hormones following prostaglandin F2a-induced luteal regression in ewes varies with day of the estrous cycle at treatment. J Anim Sci;62:422–7. 1986.

Dias, F.E.F., Junior, E.S.L., Villaroel, A.B.S., Rondina, D., Freitas, V.J.F. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, ,v. 53, n. 5, p. 618-623. 2001.

Driancourt, M.A., Gougeon, A., Royere, D., Thibault, C., Ovarian function. In: Thibault, C., Levasseur, M.C., Hunter, R.H.F. (Eds.), Reproduction in Mammals and Men. Ellipses, Paris, pp. 281–305. 1993.

Dobson, H., Ribadu, A.Y., Noble, K.M. Ultrassonography and hormones profiles of adrenocorticotrophic (ACTH) – induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. J. Reprod. Fertil., v. 120, n.2, p.405-410.2000.

Dukes M., Russell W., Walpole A.L. Potent luteolytic agents related to prostaglandin F2alpha. Nature;250:330–1. 1974.

Evans, A.C.O., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P., Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. Theriogenology 53, 699–715. 2000.

Fairnie I.J., Wales R.G., Gherardi P.B. Time of ovulation, fertilization rate, and blastocyst formation in ewes following treatment with a prostaglandin analogue (ICI 80996) [Abstract]. Theriogenology;8(4):183.1977.

Ferreira, A.M. Reprodução da fêmea bovina. Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). Juiz de fora, MG. Edição do autor. p.251. 2010.

Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. Theriogenology 79 399–408. 2013.

Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., Viñoles, CEffects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. Theriogenology, 76, 630–639. 2011.

Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L. Ovarian oxytocin and the maternal recognition of pregnancy. J. Reprod. Fertil. 76, 831–839. 1986.

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

Fonseca J.F., Bruschi, J.H. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. Rev Ciências Agrárias, 43:1-13. 2005b.

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 43, 689–703. 1995.

Godfrey R.W., Gray M.L., Collins J.R. A comparison of two methods of oestrus synchronisation of hair sheep in the tropic. Anim Reprod Sci;47:99–106. 1997.

Godfrey, R.W.; Collins, J.R.; Hensley, E.L.; Wheaton, J.E. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. Theriogenology, v. 51, p. 985-997.1999.

Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R; Freitas, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2ed. São Paulo. Roca. pág. 36. 2008.

Gong J.G., Baxter G., Bramley T.A., Webb R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin, p. a dose-response study. J Reprod Fertil, v.110, p.91-97, 1997.

Johnson, S.K., Dailey, R.A., Inskeep, E.K., Lewis, P.E. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. Dom Anim Endocrinol. 13:69–79. 1996.

Letelier, C.A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R.A., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Flores, J.M., Gonzalez-Bulnes, A. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. Theriogenology 71, 676–682. 2008.

Leyva V., Buckrell B.C., Walton J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. Theriogenology 50, 395–416. 1998.

Mann, G.E., Payne, J.H., Lamming, G.E., Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F2α secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. Domest. Anim. Endocrinol. 21, 127–141. 2001.

Martins, F.S., Silva, J.R.V. Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R. Regulatory factors of folliculogenesis in mammalian. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.36-49, jan./mar. 2008.

Menchaca, A.; Miller, V.; Gil, J.; Laca, M.; Rubianes, E. Prostaglandin F2α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. Reproduction Domestic Animal, 39, 352-355. 2004.

Monget P., Fabre S., Mulsant P., Lecerf F., Elsen J.M., Mazerbourg S., Pisselet C., Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. Dom Anim Endocrinol, v.23, p.139-54, 2002.

Olivera-Muzante J., Fierro S., López V., Gil J.. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. Theriogenology;75:1232–8.2011.

Ozyurtlu, N., Kucukasla, I., Cetin, Y. Characterization of oestrous induction response, oestrous duration, fecundity and fertility in awassi ewes during the non-breeding season utilizing both CIDR and intravaginal sponge treatments. Reprod Dom Anim 45, 464–467. 2010.

Rawlings, N.C., Jeffcoate, I.A., Rieger, D.L.,. The influence of oestradiol 17-β and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovariectomized ewes. Theriogenology 22, 473–488. 1984.

Re G, Badino P, Novelli A, Vallisneri A, Girardi C. Specific binding of dl-cloprostenol and d-cloprostenol to PGF2a receptors in bovine corpus luteum and myometrial cell membranes. J Vet Pharmacol Ther;17:455–8. 1994.

Roche, J.F., Control and regulation of folliculogenesis—a symposium in perspective. Rev. Reprod. 1, 19–27. 1996.

Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., Seasonality of reproduction in sheep. Small Rumin. Res. 48, 155–171. 2003.

Rubianes, E., Menchaca, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. Animal Reproduction Science 78, 271–287.2003.

Rubianes E, Menchaca A, Carvajal B. Response of the 1- to 5-day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2a. Anim Reprod Sci;78:47–55. 2003.

Santos, I.W., Binsfeld, L.C., Weiss, R.R., Kozicki, L.E. 2010. Fertility rates of ewes treated with medroxyprogesterone and injected with equine chorionic gonadotropin plus human chorionic gonadotropin in anoestrous season. Veterinary Medicine International Volume 2010, Article ID 978520

Sasa, A.; Teston, D.C.; Crivellenti, T.L.; Rodrigues, P.A.; Silva, E.C.F.; Coelho, L.A.; Schalch, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas durante o período de abril a novembro no Estado de São Paulo. Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, p.1150-1156, 2002.

Silva J.R.V., Tharasanit T., Taverne M.A.M., Van Der Weijden G.C., Santos R.R., Figueiredo J.R., Van Den Hurk R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. J Endocrinol, v.189, p.113-125, 2006.

Silva, B.D.M., Sartori, R., Silva, T.A.S.N., Cardozo, D.M.M., Oliveira, M.A.L., Neves, J.P. Estrus synchronization with prostaglandin f2α compared to progestogen treatment associated with equine chorionic gonadotropin (eCG) in Santa Inês breed ewes reared in Federal District, Brazil. Ci. Anim. Bras., Goiânia, v.11, n.2 417-424. 2010.

Souza, C.J.H., Campbell, B.K., Baird, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. Biol. Reprod. 56, 483–488. 1997.

Turnbull, K.E., Braden, A.W.H., Mattner, P.E. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. Aust. J. Biol. Sci. 30, 229–241. 1977.

Ulloa-Aguirre, A., Maldonado, A., Damian-Matsumura, P., Timossi, C., Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. Arch. Med. Res. 32, 520–532. 2001.

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 in the ewe. Theriogenology 51,1351–1361. 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, 55, 993-1004. 2001.

Viñoles. C., Paganoni, B., Milton, J.T.B., Driancourt, M.A., Martin, G.B. Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponges or sponges with bactericide. Anim Prod Sci;51:565–9. 2011.

Wiley, T.M., Cárdenas, H., Pope, W.F. Effect of the rate of progesterone decline at luteolysis on the ovulatory follicles and subsequent estrous cycle length in ewes. Anim Reprod Sci;46:78–87. 1997.

Wiltbank M.C., Sartori, R., Herlihy, M.M., Vasconcelos, J.L.M., Nascimento, A.B., Souza, A.H., Ayres, H., Cunha, A.P., Keskin, A., Guenther, J.N., Gumen, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. Theriogenology 76 1568–1582. 2011.

Zhou J., Adesanya O.O., Vatzias G. Hammond J.M., Bondy C.M. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. Endocrinology, v.137, p.4893-4901, 1996.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1

9.1.1. Certificado do CEUA UFF

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

Certificamos que o projeto nº 452, intitulado "Avaliação de protocolos de sincronização de estros em ovelhas da raça Santa Inês" sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão da Faculdade de Veterinária, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 26 de setembro de 2013. Este certificado é válido por três anos.

Niterói, 26 de setembro de 2013.

Fabio Otero Ascoli

Coordenador da CEUA