UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

RÔMULO MENDONÇA DA ROSA

PROTOCOLOS HORMONAIS DE SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR PARA A SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Niterói**,** RJ

2017

RÔMULO MENDONÇA DA ROSA

PROTOCOLOS HORMONAIS DE SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR PARA A SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

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

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Coorientadores: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan

Niterói, RJ

2017

PROTOCOLOS HORMONAIS DE SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR PARA A SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

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

Avaliado em 22 de Fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan – UNIGRANRIO – Coorientadora

Profa. Dra. Letícia Zoccolaro de Oliveira – UFF

Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello – UFRRJ

Niterói, RJ

2017

Dedico esse trabalho à minha mãe Dercy, ao meu irmão Ramon, à minha esposa Fernanda Paiva e minha filha Rafaela

**AGRADECIMENTOS**

À Deus e à Nossa Senhora por toda proteção.

À minha mãe Dercy Ribeiro por toda dedicação, apoio e pela educação.

À minha amada esposa Fernanda Paiva e minha filha Rafaela pela paciência, apoio e ajuda, sem o apoio de vocês esse sonho não se concretizaria.

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão, por ter me aceitado como seu orientado e principalmente por ter acreditado em mim. Obrigado pela compreensão e pela sua paciência.

À coorientadora Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan, pelo carinho, amizade, e preocupação. Obrigado por tudo, aprendi muito com você!

Ao Prof. Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca, pelos ensinamentos.

Aos professores da pós-graduação, por todo o conhecimento que me foi transmitido.

Ao Gepeco, em especial ao Dr. Mario Balaro e os alunos da graduação, obrigado por todo apoio nos ensaios.

Ao Dr. Rodolfo Ungerfeld pela ajuda no delineamento dos experimentos e realização das análises estatísticas.

À Universidade Federal Fluminense pelo acolhimento e por oferecer toda essa estrutura para realização desse trabalho.

À Faperj pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq pelo o financiamento do deste projeto (400785/2016-1).

**RESUMO**

O presente estudo objetivou comparar protocolos hormonais como ferramenta de sincronização da onda de crescimento folicular visando a superovulação. No Experimento 1 (n=66), administrou-se benzoato de estradiol (GBE), GnRH (GGnRH) e sua associação (GBE+GnRH), ou somente progesterona e prostaglandina (Gcontrole) para determinar o surgimento da nova onda de crescimento folicular. No Experimento 2 (n=22), utilizou-se o melhor tratamento do Experimento 1 (agora chamado Gteste), além de um Gcontrole e foi realizada superovulação e colheita de embriões. Em diferentes momentos, foram realizados exames ultrassonográficos e avaliação das concentrações de progesterona. As ovelhas foram acasaladas no momento do estro e laparoscopia foi realizada seis dias após. Ovelhas apresentando > 3 CL foram submetidas à colheita de embriões. No Experimento 1, 10 fêmeas não responderam ao protocolo, sendo uma ovelha do Gcontrole, seis do GBE e três do GBE+GnRH. Com relação ao tempo de emergência e dominância folicular, o GGnRH foi mais precoce (P < 0,05) comparado aos grupos que receberam BE (GBE e GBE+GnRH), mas não diferiu do Gcontrole (P > 0,05). No Experimento 2, não foram encontradas diferenças na população de folículos < 5 mm entre os grupos, no dia da inserção da progesterona (7,8 ± 2,6 *vs.* 6,0 ± 1,6; P > 0,05) e na primeira dose de FSH (8,2 ± 2,6 *vs.* 8,9 ± 2,3; P > 0,05). No dia da superovulação, no Gcontrole e Gteste, uma e duas ovelhas possuíam folículo dominante, respectivamente. O comportamento sexual e ovulação foram similares nos diferentes tratamentos. Duas fêmeas do Gteste e três do GControle não foram coletadas, em função da baixa resposta. O número de CL contados no momento da laparoscopia não diferiu (P > 0,05) entre tratamentos. Entretanto, o número de estruturas coletadas e embriões viáveis foram superiores no GControle. A taxa de recuperação também diferiu, sendo superior no GControle (75,6% *vs.* 8,1%; P<0,01). Houve maior frequência de regressão precoce do corpo lúteo no Gteste (6/10), que em GControle (1/12). O uso de BE ou GnRH não resultou em melhorias no momento do surgimento e na sincronia de nova onda de crescimento folicular e sugere-se o uso do GControle do segundo experimento para a produção de embriões em ovinos da raça Santa Inês.

Palavras-chave: MOTE, superovulação, transferência de embriões, estrógeno

**ABSTRACT**

The present study aimed to compare hormonal treatments as a tool to induce follicular wave synchronization for later superovulation. In Experiment 1 (n=66), estradiol benzoate (GEB), GnRH (GGnRH) and their association (GEB+GnRH), or only progesterone and prostaglandin (Gcontrol) were used. In Experiment 2 (n=22), the best treatment of Experiment 1 (now named Gtest), besides Gcontrol were applied for superovulation and embryo collection. In different moments, ultrasound exams and plasma progesterone concentrations were obtained. Ewes were mated when in estrus and laparoscopy was performed six days after. Females presenting > 3 CL were subjected to embryo collection. In Experiment 1, 10 females did now answer to treatment (one from Gcontrol, six from GEB and three from GEB+GnRH). Regarding the follicular emergence and dominance, GGnRH was more precocious (P < 0.05) than the groups receiving EB (GEB and GEB+GnRH), but did not differ from Gcontrol (P > 0.05). In Experiment 2, there were no differences in follicular (< 5 mm) population between groups, at the day of progesterone insertion (7.8 ± 2.6 *vs.* 6.0 ± 1.6; P > 0.05) and at the first dose of FSH (8.2 ± 2.6 *vs.* 8.9 ± 2.3; P > 0.05). At the day of superovulation, at Gcontrol and Gtest, one and two ewes had dominant follicle, respectively. Sexual behaviour and ovulation were similar in both treatments. Two females from Gtest and three from GControl were not collected, due to the low response. The number of CL counted in the laparoscopy did not differ (P > 0.05) between treatments. However, the number of structures recovered and viable embryos were superior in GControl. The recovery rate also differed, being superior in GControl (75.6% *vs.* 8.1%; P < 0.01). Higher frequency of premature regression of corpora lutea was observed in Gtest (6/10), than in GControl (1/12). The use of EB or GnRH did not result in extra benefits in the moment of emergence and synchrony of a new follicular wave and we suggest the use of GControl of the Experiment 2 for embryo production in Santa Inês ewes.

Keywords: MOET, superovulation, embryo transfer, estrogen.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**Figura 1.** Protocolos hormonais testados no Experimento 1, para a sincronização de onda folicular, p.49

**Figura 2.** Representação esquemática dos grupos experimentais controle (A) e tratado (B) do Experimento 2, p. 51

**Figura 3.** Concentração plasmática de progesterona (P4) nos dias experimentais (D-5 à D5) no grupo controle (n=12; A-M) e grupo teste (n=10; A-J) em ovelhas da raça Santa Inês, p. 61

1. **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Peso escore da condição corporal de ovelhas submetidas a sincronização da onda folicular, p. 47

**Tabela 2.** Peso escore da condição corporal dos animais do 2º experimento, p. 48

**Tabela 3.** Ciclicidade ao início do tratamento, resposta ao tratamento, status ovariano e momento da emergência e dominância da primeira onda folicular após a realização de quatro protocolos hormonais em ovelhas da raça Santa Inês (média ± EPM), p. 58

**Tabela 4.** Avaliação dos intervalos (horas) da retirada do progestágeno/progesterona ao início do estro (IRE); duração do estro (DE); retirada do progestágeno/progesterona à primeira observação da ovulação (IRPO); fim da superovulação à primeira observação da ovulação (IFSOVPO) e início do estro à primeira observação da ovulação (IIEPO), em diferentes protocolos de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês (média ± EPM) , p. 59

**Tabela 5.** Recuperação embrionária e avaliação das estruturas recuperadas a partir de ovelhas da raça Santa Inês superovuladas utilizando dois tratamentos superovulatórios distintos (média ± EPM), p. 62

**LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS E SIGLAS**

1. % .....................................................................................................Porcentagem
2. ± ....................................................................................................Mais ou menos

° .....................................................................................................................Grau

1. µg ......................................................................................................Micrograma
2. CL ......................................................................................................Corpo Lúteo
3. CLG ................................................................................Células Lúteas Grandes
4. CLP ..............................................................................Células Lúteas Pequenas
5. Dr. ..............................................................................................................Doutor
6. Dra. .........................................................................................................Doutora
7. E2 .........................................................................................................Estrogênio
8. ECC .......................................................................Escore de Condição Corporal
9. eCG ...................................................................Gonadotrofina Coriônica Equina
10. EMBRAPA ...................................Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
11. et al. ............................................................................................e colaboradores
12. FD...........................................................................................Folículo Dominante
13. FSH ......................................................................Hormônio Folículo Estimulante
14. GnRH .......................................................Hormônio Liberador de Gonadotrofina
15. hCG .................................................................Gonadotrofina Coriônica Humana
16. IA .........................................................................................Inseminação Artificial
17. IATF ..........................................................Inseminação Artificial em Tempo Fixo
18. IM ....................................................................................................Intramuscular
19. IVSM ..................................................................................Intravulvosubmucosal
20. Kd .......................................................................................................Quilodalton
21. kg ........................................................................................................Quilograma
22. LH .....................................................................................Hormônio Luteinizante
23. MHz ......................................................................................................Megahertz

mL ..............................................................................................................Mililitro

1. mm .........................................................................................................Milímetro

MUL ......................................................................................................Multíparas

1. N................................................................................................................Número
2. NDT ...........................................................................Nutrientes digestíveis totais
3. ng/mL ...............................................................................Nanograma por mililitro

NUL .......................................................................................................Nulíparas

OX .........................................................................................................Ocitocina

1. p .................................................................................................................Página
2. P>0,05 ................................................................................Probabilidade de erro
3. P4 .....................................................................................................Progesterona
4. P45017α .............................................................Citocromo P450 17α hidroxilase

P450arom ...............................................................................................Aromatase

P450scc............................... Enzima de clivagem da cadeia lateral de colesterol

1. PB ..................................................................................................Proteína bruta
2. PG ...................................................................................................Progesterona
3. PGF2α ......................................................................................Prostaglandina F2α
4. Prof ........................................................................................................Professor
5. PVC ................................................................................. Policloreto de Polivinila
6. RNAm .........................................................................................RNA mensageiro
7. RPCL .......................................................Regressão Prematura do Corpo Lúteo

SE .................................................................................... Sincronização do estro

SNC ................................................................................Sistema nervoso central

1. UFF .................................................................Universidade Federal Fluminense
2. US .................................................................................................Ultrasonografia
3. α ...................................................................................................................Alpha
4. **SUMÁRIO**
5. **1. INTRODUÇÃO, p. 14**
6. **2. REVISÃO DE LITERATURA, p. 16**
7. 2.1 Particularidades da reprodução de ovinos, p. 16
8. 2.1.1 Estacionalidade reprodutiva, p. 16
9. 2.1.2 Puberdade, p. 18
10. 2.1.3 Ciclo estral, p. 19
11. 2.2 Ciclos ovarianos, p. 21
12. 2.2.1 Dinâmica folicular, p. 21
13. 2.2.2 Dinâmica luteal, p. 27
14. 2.2.2.1 Regressão prematura de corpo lúteo (RPCL), p. 30

2.3 Produção in vivo de embriões, p. 31

2.3.1 Histórico da técnica e aplicações, p. 31

2.3.2 Descrição da técnica, p. 32

2.3.2.1Seleção de doadoras e receptoras, p. 32

2.3.2.2 Sincronização de estro e superovulação, p. 33

2.3.2.3 Acasalamento, p. 38

2.3.2.4 Coleta de embriões, busca e seleção, p. 39

2.3.2.5 Criopreservação, p. 40

2.3.3 Fatores que afetam a produção quantitativa e qualitativa de embriões, p. 42

1. **3. OBJETIVOS, p. 45**
2. 3.1 OBJETIVO GERAL, p. 45
3. 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 45
4. **4. MATERIAL E MÉTODOS, p. 46**
5. 4.1 Desenho do estudo, p. 46
6. 4.2 Localização e período experimental, p. 46
7. 4.3 Animais experimentais, p. 46
8. 4.3.1 Ovelhas, p. 46
9. 4.3.2 Carneiros, p. 48
10. 4.4 Grupos experimentais, p. 48
11. 4.5 Avaliação do comportamento sexual e acasalamento, p. 51
12. 4.6 Avaliação ultrassonográfica, p. 51
13. 4.7 Avaliação do número de corpos lúteos e coleta de embriões, p. 53
14. 4.8 Sedação, anestesia, controle de dor e medicação pós-cirúrgica, p. 54
15. 4.9 Dosagem de progesterona, p. 55
16. 4.10 Análise estatística, p. 56
17. **5. RESULTADOS, p. 57**
18. 5.1 Experimento 1, p. 57
19. 5.2 Experimento 2, p. 58
20. **6. DISCUSSÃO, p. 64**
21. **7. CONCLUSÃO, p. 68**
22. **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 69**

**9. ANEXOS, p. 92**

**1. INTRODUÇÃO**

A criação de ovinos ao redor do mundo tem tido grande importância ao longo da história, como fonte de carne, leite, pele e lã. A maior população de ovinos no Brasil encontra-se na região Nordeste, com pouco mais de 50% do efetivo total do país. No Estado do Rio de Janeiro, apesar de o efetivo ser ainda relativamente pequeno (cerca de 4%), vem crescendo nos últimos anos (IBGE, 2014). Para organizar 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). Apesar de pequenos, os rebanhos no Estado do Rio de Janeiro são relativamente mais tecnificados, favorecendo a adoção de biotecnologias da reprodução que podem contribuir sobremaneira para a elevação da produtividade dos animais.

Dentre as biotécnicas da reprodução animal, a produção *in vivo* de embriões, ou seja, a técnica de múltipla ovulação seguida de transferência de embriões (MOTE), apresenta inúmeros benefícios. Provavelmente, o maior deles, é a possibilidade de grande difusão de melhoramento genético de forma mais rápida, já que a técnica é eficiente para a obtenção de progênies de fêmeas geneticamente superiores (RUBIANES et al., 1995). Se adequadamente orientada, a MOTE pode representar não somente a possibilidade de multiplicação de genótipos superiores, mas, também, a possibilidade de conservação e multiplicação de animais ou raças ameaçadas de extinção. Entretanto, dentre as biotecnologias de reprodução assistida, a MOTE possivelmente é a mais frustrante, uma vez que resultados variam do sucesso total ao fracasso total sem, contudo, haver nenhuma modificação no protocolo de estímulo e mudanças operacionais (BALDASSARE & KARATZAS, 2004).

A superovulação é o evento menos previsível na técnica de MOTE e, além disso, ainda existe grande variabilidade na resposta. O conhecimento dos mecanismos que regulam a dinâmica folicular é de fundamental importância para obtenção de êxito na superovulação permitindo assim o aumento da fertilidade. Já é bem conhecido que a eficiência dos protocolos superovulatórios varia em função do estádio de crescimento folicular presente no ovário por ocasião do início da administração de FSH (GONZALEZ-BULNES et al., 1999; FONSECA et al., 2006). Sabe-se que a sincronização do estro facilita e otimiza os processos envolvidos nos programas de superovulação e transferência de embriões (FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008), sendo normalmente aplicada em associação à superovulação.

Uma estratégia antiga em bovinos e mais recente em ovinos é a sincronização da onda folicular, utilizada em associação à superovulação. Entretanto, apesar dos inúmeros relatos na espécie bovina, poucos são os estudos comparando diferentes estratégias hormonais para este fim em ovinos. Avanços nos protocolos de sincronização da onda folicular e superovulação, visando múltiplas coletas em ovelhas de alto valor genético e a redução das variações nas taxas de ovulação e de recuperação de embriões, podem contribuir para o melhor aproveitamento da exploração comercial nos programas de MOTE de pequenos ruminantes. Assim, este estudo objetivou avaliar a utilização de quatro protocolos hormonais para a sincronização da emergência folicular.

**2. REVISÃO DE LITERATURA**

2.1 PARTICULARIDADES DA REPRODUÇÃO DE OVINOS

2.1.1 Estacionalidade reprodutiva

Os ovinos são animais poliéstricos estacionais, apresentando vários ciclos estrais durante a estação reprodutiva. Fatores ambientais e raça são pré-requisitos a serem considerados ao se analisar os estros das fêmeas ovinas. Em decorrência da preponderância da latitude sobre a raça, os estros estarão concentrados em um período de tempo definido durante o ano, onde o fotoperíodo (número de horas de luz por dia) é menor, a estação de acasalamento natural. Há uma influência direta da latitude sobre a estação reprodutiva. Portanto, quanto mais longe da linha do Equador, maior latitude, maior a influência do fotoperíodo e a estacionalidade reprodutiva tende a ser mais evidente (DA COSTA, 2007). Sendo assim, as ovelhas devem apresentar um parto por ano. Ao se aproximar da linha do Equador, essa influência é diminuída ou ausente (FONSECA et al., 2007). A estacionalidade garante um momento propício para o nascimento, desenvolvimento e sobrevivência das proles (ROSA & BRYANT, 2003). Segundo Shelton (1978), o fotoperíodo influencia tanto machos quanto fêmeas. No caso dos machos, a produção espermática ocorre durante todo o ano, porém, sua capacidade fecundante se mostra superior no outono e inferior na primavera, atestando o efeito do fotoperíodo (SÁ, SÁ, 2006).

O fotoperíodo é primeiramente percebido pela retina e o estímulo nervoso decorrente é transmitido por um caminho neural com vários passos, que envolve o núcleo supraquiasmático e o gânglio cervical superior para a glândula pineal (KARSCH et al., 1984). A glândula pineal, ligada ao SNC através de inervação simpática, atua como um verdadeiro transdutor, convertendo a informação neural dependente do ciclo noite-dia (24 h) em sinal hormonal pela variação no tempo de secreção de melatonina. Como a melatonina é secretada somente na escuridão, a duração da secreção difere entre os dias longos e curtos (KARSCH et al., 1988). A melatonina age no hipotálamo médio basal modulando a pulsatilidade da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (MALPAUX et al., 1996).

Segundo Rodrigues (2001), a incidência de estro em ovinos está inversamente relacionada ao comprimento do dia, ou seja, a máxima atividade sexual coincide com os dias em que há declínio da luminosidade. Dessa forma ocorre a seguinte divisão: estação reprodutiva (final do verão ao início do inverno), anestro (início do inverno ao início do verão) e estação de transição (verão), sendo que a melhor estação reprodutiva é o outono (FONSECA, 2005). No entanto, em regime de exploração extensiva, quando os animais são mantidos em pastagens nativas, verifica-se que a época de maior atividade sexual coincide com o período de chuvas. Este fato pode estar relacionado com a redução da irradiação solar e maior oferta qualitativa e quantitativa de forragem durante esse período (NOGUEIRA et al., 2008).

As diferentes latitudes do território brasileiro acarretam uma grande variação na duração da estação reprodutiva dos ovinos. Na região Nordeste do Brasil, as ovelhas deslanadas ciclam ao longo do ano (FIGUEIREDO et al., 1980; GIRÃO et al., 1984). Na região Sul, vários trabalhos realizados com raças de duplo propósito e especializadas para produção de carne apresentaram uma estação reprodutiva mais restrita à estação de outono (NUNES & FIGUEIRÓ, 1975; SILVA & FIGUEIRÓ, 1980; RIBEIRO et al., 1996). Constata-se atividade sexual limitada à determinada época do ano, nos ovinos provenientes de região de climas temperados e subtropical.

Na região Sudeste, observa-se certa estacionalidade na atividade reprodutiva nas ovelhas lanadas (PRUCOLLI & BACCARI Jr., 1967; RODA *et al*., 1993). Nessa mesma região, a estacionalidade reprodutiva foi verificada em ovelhas lanadas das raças *Suffolk* e *Romney Marsh*, através da análise ao longo do ano do perfil de concentrações plasmáticas de melatonina. Todavia, as ovelhas da raça Santa Inês não apresentaram estacionalidade, mesmo que seu perfil de melatonina tenha sido o mesmo encontrado nas raças lanadas. Pode-se dizer que nas ovelhas Santa Inês, a glândula pineal não exerce de modo significativo influência no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, sendo, portanto, o fator genético mais importante (SASA *et al.,* 2002). Estes autores sugeriram que a estacionalidade reprodutiva em ovelhas da raça Santa Inês parece estar condicionada a outros fatores, como idade e condição corporal dos animais. Sabe-se que no início da estação de monta, quanto mais próximo do ideal estiver o escore da condição corporal (ECC), maior será a taxa de prenhez. Fêmeas apresentando baixo ECC são susceptíveis a maiores problemas na reprodução, reduzidas taxas de partos gemelares e baixo desempenho das crias ao desmame.

O anestro, período no qual não há atividade sexual, a emergência da onda folicular é atribuída às flutuações de concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante (FSH). Os folículos atingem tamanhos pré-ovulatórios, mas entram em atresia (KARSCH *et al*., 1993; BARTLEWSKI *et al*., 1998). Durante a contra-estação reprodutiva, a secreção tônica do hormônio luteinizante (LH) é inibida pelas baixas concentrações de estradiol (E2) 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). Segundo Cupps (1991), a atividade sexual começa entre 60 a 120 h após a diminuição da quantidade de horas luz. O aumento da duração da secreção da melatonina parece exercer efeito indireto sobre o padrão de resposta dos neurônios produtores de GnRH ao E2, 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).

2.1.2 Puberdade

Para que os ciclos reprodutivos tenham início, as fêmeas devem passar por um período denominado puberdade (CUNNINGHAM, 2004). De acordo com Hafez (2004), uma fêmea pode ser considerada púbere, quando se torna capaz de ovular e apresentar um comportamento sexual completo. Vários são os fatores que influenciam a puberdade, como: ambiente, fotoperíodo, padrão racial, peso corporal e taxa de crescimento antes e depois do desmame. A idade à puberdade também é regulada pelos níveis nutricionais. Se o crescimento for acelerado por superalimentação, o animal atinge a puberdade em idade mais precoce. Em contrapartida, se o crescimento for mais lento devido à subalimentação, a puberdade é retardada (HAFEZ, 1982). O início da atividade sexual, tanto em machos como em fêmeas, é de grande importância na exploração animal, inicia-se quando os animais se reproduzem e entram na fase produtiva. A puberdade fisiológica da fêmea, desencadeada pelos efeitos hormonais, é dada pelo crescimento dos folículos, pela exteriorização do cio e pela ovulação. Nos machos a puberdade é alcançada quando os animais são capazes de realizar monta completa com a presença de espermatozoides no ejaculado. O inicio da atividade reprodutiva em ovinos Santa Inês varia de seis a oito meses (FONSECA et al., 2007).

Durante o primeiro ano de atividade reprodutiva a fertilidade das borregas é baixa comparada à de ovelhas adultas (DYRMUNDSSON, 1978). Uma série de indicativos demonstra que as fêmeas ovinas continuam sexualmente imaturas por algum tempo após atingirem a puberdade, quando a mesma é definida como a ocorrência do primeiro estro. Alguns dos eventos observados incluem a curta duração do estro e a baixa intensidade de sua manifestação (HAFEZ, 1952; DYRMUNDSSON, 1978), bem como a presença de ovulações silenciosas (HARE & BRYANT, 1982; ABECIA et al., 1996) e de ciclos estrais irregulares ou longos (HAFEZ, 1952; BATHAEI, 1996).

2.1.3 Ciclo estral

O ciclo estral é um conjunto de eventos reprodutivos que se repetem em intervalos regulares, inicia-se no estro e termina no estro seguinte e é regulado por diversas modificações neuroendócrinas, resultantes da interação do SNC (hipotálamo, hipófise) e do sistema reprodutor (ovários e útero) (MORELLO & CHEMINEAU, 2008). Em ovelhas, o ciclo estral tem uma duração de 17 ± 2 dias e apresenta duas fases: fase luteal e fase folicular. A fase luteal se estende desde o dia dois do ciclo (estro = dia zero), até aproximadamente o dia 13. A fase folicular ocorre desde o dia 14 até o primeiro dia do ciclo (RUBIANES, 2000). Durante este período, os hormônios gonadotróficos FSH e LH, secretados pela hipófise, controlam o desenvolvimento folicular e esteroidogênese, culminando na secreção de E2 que leva ao comportamento de estro (FONSECA, 2005). Heape (1990), propõe uma outra forma de dividir o ciclo estral: proestro, estro, metaestro e diestro.

O proestro se inicia após a luteólise. É marcado pela elevação das concentrações circulantes de E2. A queda da concentração de P4 possibilita o aumento da pulsatilidade de LH, que age sobre os receptores foliculares de LH, levando ao aumento da produção e secreção de E2 pelo folículo pré-ovulatório (BARTLEWSKI et al., 2011). Ao mesmo tempo, o E2 atua por meio de *feedback* sobre a secreção hipofisária de FSH, de modo que no proestro a concentração plasmática desta gonadotrofina se encontra em níveis mínimos (BAIRD, 1978). Segundo Bartlewski et al. (2011), a inibina também atua neste feedback exercido pelo folículo pré-ovulatório sobre o FSH. Esta fase tem duração de dois a três dias.

O estro se caracteriza por ser o período em que a fêmea fica receptiva ao macho e é marcado por uma série de alterações comportamentais e anatômicas. Seu início é determinado como o momento em que a fêmea aceita a monta pela primeira vez (PACHECO & QUIRINO, 2010), sendo este, o comportamento mais evidente da fêmea em estro. Neste período, as fêmeas apresentam redução do apetite e diminuição da produção leiteira, tornam-se inquietas, urinam e berram com frequência, movimentam a cauda e procuram se aproximar do macho, quando este está presente. A vulva apresenta-se edemaciada e hiperêmica, observa-se corrimento de muco pela vagina, sendo este de aspecto aquoso no início, e denso no final do estro. A elevação das concentrações circulantes de E2 culmina em uma descarga de GnRH, que leva à um pico pré-ovulatório de LH e FSH. O pico de LH ocorre cerca de 14 h antes da ovulação (BARTLEWSKI et al., 2011). A duração aproximada, do estro, nas ovelhas é de 30 h (BICUDO et al., 2005; MORELLO & CHEMINEAU, 2008). Objetivando o máximo de fertilidade, ressalta-se a importância da identificação correta da fêmea em estro, para que se faça a inseminação artificial ou monta controlada no momento mais adequado.

Quando a fêmea para de aceitar a monta, inicia-se o metaestro. A inibição sobre o FSH cessa e uma nova onda desta gonadotrofina tem lugar entre 20 e 36 h após ovulação (BAIRD, 1978). A ovulação pode ser única ou múltipla e ocorre predominantemente no final do estro ou logo após o seu fim (GORDON, 1997; FONSECA, 2002). Ovulações duplas e triplas são comuns e estas ocorrem dentro de duas horas após a primeira ovulação (LINDSAY, 1991). Desta forma, a espécie ovina possui maior prolificidade quando comparada à espécie bovina. O pico do LH conduz à ovulação do folículo pré-ovulatório e subsequente formação do CL. Enquanto o CL se desenvolve, as concentrações de P4 secretadas aumentam. As concentrações de P4 se elevam entre os dias três e sete do ciclo, até alcançar um platô por volta do dia 12 do ciclo estral (BARTLEWSKI et al., 1999a).

O diestro pode ser compreendido como o período que vai desde o estabelecimento da função luteal até a luteólise em ovinos (BARTLEWSKI et al., 2011). Entre os dias 11 e 12 do ciclo, se inicia o mecanismo de retroalimentação positiva ocitocina (OX) luteal – prostaglandina F2α (PGF2α) endometrial, que culmina com a lise do CL. Isso leva a uma queda brusca das concentrações de P4 plasmáticas por volta do dia 13. A queda da P4 permite o aumento dos pulsos de GnRH e do LH, que estimula a secreção de E2 pelo ovário. O rápido aumento da concentração de E2 estimula o comportamento estral e o aumento pré-ovulatório de LH. O aumento de LH induz a ovulação e luteinização, o que diminui a secreção de E2, iniciando-se um novo ciclo (VIU et al., 2006).

2.2 CICLOS OVARIANOS

2.2.1 Dinâmica folicular

O ciclo ovariano é o fenômeno central da função reprodutiva e caracteriza-se pela atividade sincrônica e cíclica de proliferação, diferenciação e transformação celular, que resultam no desenvolvimento folicular e na ovulação, assim como na formação, ativação e regressão do corpo lúteo (BERICHA & SCHAMS, 2005). Com o advento da ultrassonografia abriram-se novas possibilidades para o estudo e compreensão dos fenômenos da dinâmica ovariana folicular e luteal.

O desenvolvimento do ovário em pequenos ruminantes progride por meio dos estágios de mitose e meiose. Segundo Magre (2006), a foliculogênese inicial e subsequente desenvolvimento folicular ainda ocorrem durante a vida pré-natal. Ao atingir o estágio de diplóteno da prófase meiótica, o oócito é rodeado por uma única camada de células escamosas da pré-granulosa estabelecendo um *pool* de folículos primordiais. Em ovinos, podem ser encontrados de 40.000 a 300.000 folículos primordiais nesta fase (DRIANCOURT et al., 1993). Devido a razões incertas, a morte maciça por apoptose de folículos primordiais ocorre a partir do meio da gestação até o nascimento do concepto (aproximadamente 20x) e ao longo da vida pós-natal (cerca de 35x) (DRIANCOURT et al., 1993). Ainda na fase infantil, pela sinalização parácrina, os folículos primordiais vão sendo ativados (ROCHE, 1996) e se transformam em folículos primários, caracterizados por uma única camada de células cubóides da granulosa em torno do oócito. Tornam-se folículos secundários ao atingirem duas ou três camadas de células cubóides. Nesta etapa, é iniciada a diferenciação das células da teca e a formação de várias cavidades preenchidas por líquido. Estas se unem durante a formação do folículo terciário ou antral.

Aparentemente, as gonadotrofinas não são um pré-requisito para o desenvolvimento folicular em seus estágios iniciais (CAMPBELL et al., 2003; WEBB et al., 2003). Ao final do estágio gonadotrofina independente, os folículos ovarianos passam a responder aos hormônios gonadotróficos e entram na fase gonadotrofina dependente, um pré-requisito para atingir o crescimento folicular antral e maturação (CAMPBELL, SCARAMUZZI & WEBB, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que, nas ovelhas, os folículos tornam-se gonadotrofina-dependente quando atingem cerca de 2-3 mm (CAMPBELL, et al., 1995). A partir da puberdade, os folículos terciários avançam para a fase pré-ovulatória em que o oócito continua a meiose a partir da metáfase II.

Nas diferentes fases do ciclo estral, existem nos ovários cerca de 200 a 400 folículos, que se encontram em fase de crescimento (LUCY et al.,1992). Destes, 25 a 50 serão folículos terciários, dos quais um será selecionado como folículo dominante, adquirindo por sua vez, características para realizar sua maturação e a ovulação. As características do folículo pré-ovulatório são similares entre as espécies. Dentre elas, podemos citar: expressão da aromatase nas células da granulosa, altas concentrações de estradiol no fluido folicular e a presença de receptores para LH nas células da granulosa (FOXCROFT & HUNTER, 1985; CAMPBELL et al., 1995; SHORES & HUNTER, 1999; WEBB et al., 2003). O diâmetro dos folículos nos quais as células da granulosa, primeiramente, apresentam receptores para LH é de 3,5 mm (LUCY et al., 2001; CAMPBELL et al., 2003).

Segundo diversos autores (CAHILL et al*.*, 1981; GONÇALVES, FIGUEIREDO & FREITAS, 2008), são necessários 120 dias para que um folículo se desenvolva até o estágio pré-ovulatório na ovelha adulta. O tamanho do folículo pré-ovulatório é de 5-7 mm de diâmetro (HUNTER *et al*., 2007), sendo considerado o menor folículo pré-ovulatório entre as espécies de produção.

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 cerca de quatro dias depois (CAHILL & MAULEON, 1980; BARTLEWSKI et al., 2011).

Durante o ciclo estral, grupos de folículos emergem em momentos intercalados, caracterizando as ondas foliculares (GORDON, 1997; EVANS, 2003). Em ovelhas, uma onda de crescimento folicular pode ser definida como um ou mais folículos, oriundos de um conjunto de pequenos folículos antrais que crescem até atingir um diâmetro maior ou igual a 5 mm, prosseguindo para uma atresia ou para uma ovulação (BARTLEWSKI et al., 1999b), portanto, uma vez iniciado o processo de crescimento, este é contínuo. Assim, alguns folículos que iniciam seu crescimento ovulam, enquanto a maioria deles entra em atresia antes de atingir esse estágio (FORTUNE, 1994).

A quantidade de ondas apresentadas nos ovinos sofre variação individual com a média de três ondas foliculares. Estas ondas emergem em intervalos de quatro a seis dias, tanto na estação reprodutiva como durante o anestro estacional (RUBIANES, 2000; MENCHACA & RUBIANES, 2004). O número de ondas está relacionado diretamente com a duração do ciclo, onde Evans et al*.* (2000), observaram que um ciclo com duas ondas durou 15,6 ± 1,6 dias, o ciclo com três ondas durou 16,1 ± 1,1 dias e o ciclo com quatro ondas 17 dias. A primeira onda folicular se inicia no dia um do ciclo estral, em um momento onde as concentrações plasmáticas de P4, produzida pelo CL recém-formado, estão baixas. 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 P4 presentes. Isto acarreta em uma baixa inibição sobre a pulsatilidade do hormônio LH liberado pela adenohipófise. 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., 1999c). Com a elevação das concentrações de P4 no decorrer do ciclo estral, a segunda e a terceira onda tem menor duração que a primeira e o folículo dominante dessas ondas alcançam diâmetros menores (LEYVA et al., 1998).

Em estudos para caracterizar a dinâmica da onda folicular, observou-se que, em cada onda, ocorrem os seguintes eventos: emergência, seleção, e dominância (EVANS, 2003). As fases de emergência e seleção ocorrem continuamente nos ovários, gerando o *pool* de pequenos folículos antrais. 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). Os folículos são recrutados quando apresentam 2 a 3 mm (EVANS et al., 2000). O desvio ocorre quando há uma divergência no crescimento do folículo, onde um vai se tornar dominante e outros irão se tornar subordinados. Na fase de dominância, o folículo dominante continua a crescer até ovular ao passo que os subordinados sofrem atresia (MENCHACA, PINCZAK & RUBIANES, 2002).

O FSH é o principal hormônio envolvido no crescimento folicular e sua concentração é controlada pela inibina e pelo estradiol produzidos pelo folículo dominante (FD). Em ovelhas, a emergência de ondas foliculares é precedida por um aumento do FSH (ADAMS, 1999; WEBB et al., 2003). De fato, esse aumento, na fase de regressão luteal, estimula o desenvolvimento de um determinado número de folículos antrais que por sua vez adquirem algumas propriedades chave, tais como: aumento da expressão do complexo enzimático de clivagem da cadeia lateral do citocromo (P450scc) e aumento da atividade da enzima aromatase (P450arom) (BAO & GARVERICK, 1998; GARVERICK et al., 2002). Tem sido relatado que a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para os receptores gonadotróficos do citocromo P450 17α hidroxilase (P45017α) e 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3β-HSD) não diferem entre os folículos recrutados ou não. Entretanto, a expressão do complexo enzimático de clivagem de P450scc e P450arom são maiores em folículos recrutados, ou seja, a habilidade do folículo produzir estradiol (E2) pode determinar a sua capacidade de responder a onda de FSH durante o recrutamento (BAO & GARVERICK, 1998; WEBB et al., 1999). Após a fase de recrutamento ocorre um declínio das concentrações de FSH, por meio de *feedback* negativo do estradiol e da inibina A (família do fator de transformação do crescimento beta - TGF-β). Em vacas, decréscimo das concentrações circulantes de FSH resultam numa rápida divergência entre o folículo dominante e o subordinado (KULICK et al., 1999). Tem sido demonstrado que injeções de FSH podem anular o processo de seleção folicular (MIHM et al., 1997).

Na seleção folicular, as células da granulosa adquirem receptores para LH que por sua vez são fundamentais para o desenvolvimento posterior do folículo (CAMPBELL et al., 1995; WEBB et al., 2003). Nesta etapa, a habilidade do folículo em continuar produzindo E2 e responder as gonadotrofinas é o diferencial entre continuar a seleção ou entrar em atresia (FORTUNE et al., 2001). As células da granulosa aumentam a expressão de RNAm para receptores de FSH, P450scc e P450arom visando aumentar a sensibilidade do estímulo pelas gonadotrofinas e incrementar a produção de E2. De modo similar, aumenta a expressão de P45017α e 3β-HSD nas células da teca (BAO & GARVERICK, 1998; WEBB et al., 1999).

A dominância é a etapa final da foliculogênese na qual um ou mais folículos alcançam um rápido desenvolvimento morfológico e endócrino, enquanto outros folículos menores são suprimidos (WEBB et al., 1999). É a última etapa antes da ovulação. Nela estão presentes um a dois folículos, medindo de 2,5 a 6,0 mm. A P450arom apresenta máxima atividade elevando, por consequência, a concentração de E2. Cerca de 90% do estradiol circulante é proveniente da produção folicular (CAMPBELL, SCARAMUZZI & WEBB, 1996). O E2 parece exercer um efeito, dose dependente, na liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e produção de receptores para o mesmo. Adicionalmente, o E2 estimula um padrão de secreção bifásica, reduzindo o tamanho do pulso, porém aumentando da frequência do mesmo (EVANS, McNEILLY & WEBB, 1994). Nesta etapa, também ocorre uma maior produção de inibina A pelas células da granulosa do folículo que junto às concentrações elevadas de E2 culminam com a diminuição do FSH e contribuem para a divergência e atresia de folículos menores (CAMPBELL, SCARAMUZZI & WEBB, 1995; MEDAN et al., 2005). Assim, pode-se supor que o E2 altere o padrão de sensibilidade hipofisária ao GnRH para aumentar a liberação do LH e reduzir o FSH. Assim, ocorre uma mudança da dependência de FSH para uma dependência de LH e o suporte adequado de LH é essencial para a sobrevivência do folículo dominante (SOUZA, CAMPBELL & BAIRD, 1997). Segundo Webb et al. (2004), a presença de receptores para LH assim como seu padrão pulsátil característico é o que conferem capacidade ovulatória ao folículo dominante.

Dentro de uma onda folicular, todos os folículos apresentam potencial para se tornar dominantes. Entretanto, apenas um folículo consegue estabelecer esse padrão, principalmente devido a diferenças na expressão de receptores para LH e FSH e a inibição da liberação de FSH endógeno pela produção de E2 e inibina (KO et al., 1991).

Em pequenos ruminantes, tem sido questionado o termo “dominância” em virtude da não observância do mesmo padrão de dominância que ocorre em grandes ruminantes (MEDAN et al., 2005; CUETO et al., 2006; SIMÕES & MASCARENHAS, 2007). Em bovinos, a dominância folicular parece ser controlada por vários mecanismos agindo em conjunto, que incluem alterações da concentração endógena de FSH pelo estradiol e inibina secretada pelo folículo dominante durante a fase de crescimento folicular. Folículos subordinados não sobrevivem na depleção do FSH e sofrem atresia (GINTHER et al*.*, 2001). Em contraste, o folículo dominante sobrevive na baixa de FSH já que ele desenvolve mecanismos intrafoliculares para amplificar o suporte de gonadotrofina (FORTUNE et al*.*, 2001). Bartlewski et al. (2011), observaram em ovelhas que o folículo dominante de uma onda folicular não exerce efeito inibitório sobre a emergência de uma nova onda folicular e o desenvolvimento de pequenos folículos antrais, como ocorre nos bovinos e outros ruminantes, somente inibe o crescimento dos folículos abaixo dele. Pode-se concluir, portanto, que mais de um folículo pode atingir o diâmetro pré-ovulatório numa mesma onda e que folículos de duas ondas consecutivas podem ovular ao mesmo momento, sugerindo co-dominância. A partir desses estudos, sugere-se que a dominância folicular é fraca ou ausente nas ovelhas (EVANS, 2003; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011)

Se o folículo não ovular, devido a uma alta concentração de P4, a concentração de E2 e inibina tende a cair, assim a concentração de FSH volta a aumentar e promove o crescimento da onda subsequente (MIHM et al*.*, 2002).

2.2.2 Dinâmica Luteal

O CL é uma glândula endócrina transitória altamente vascularizada (CUPPS,1991), apresentando variações em tamanho, estrutura e atividade esteroidogênica de acordo com os diferentes estágios do ciclo estral e gestação (FIELDS & FIELDS, 1996). Sua principal função é a produção de P4, um hormônio esteroide, essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação em muitas espécies (NISWENDER et al., 2000) e pequenas quantidades de E2, PG e hormônios peptídeos como relaxina, OX, vasopressina e inibina (FIELDS, 1991).

Segundo Davis e Rueda (2002), a formação do CL resulta do crescimento, diferenciação, reorganização e luteinização das células da teca e da granulosa remanescentes do folículo ovulatório. A onda pré-ovulátoria de LH inicia diversas mudanças na expressão e regulação das enzimas esteróides e é a chave para o processo de luteinização (GURAYA, 2000). As células da granulosa dão origem às células lúteas grandes (CLG) e as da teca dão origem as células lúteas pequenas (CLP). Com o passar dos dias, essas células aumentam de tamanho e as CLP, apresentam de 16 a 18 µm em média, enquanto as CLG, cerca de 26 a 31 µm, até atingirem o pico e, após esse período elas começam a regredir (SANGHA, SHARMA & GURAYA, 2002). Segundo autores (ALILA & HANSEL, 1984), o CL apresenta ainda, células endoteliais, pericitos, células da musculatura lisa, macrófagos, leucócitos e plasmócitos.

As células remanescentes da teca e da granulosa do folículo ovulatório, que até então sintetizavam estradiol, são reorganizadas para formarem o CL e sintetizarem P4 após a ovulação. Para tal mudança de especialidade, ocorre uma diminuição na expressão da enzima P450arom, que converte a androstenediona em E2 (VOSS & FORTUNE, 1993). Essa mudança determina o início da luteinização das células da teca e da granulosa. Entretanto, para que a P4 seja sintetizada em grande quantidade, além da diferenciação celular, necessariamente deverá ocorrer um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P4 e das proteínas transportadoras de colesterol para o interior da membrana mitocondrial. O colesterol transportado para membrana mitocondrial interna interage com a enzima P450scc que o cliva, transformando-o em pregnenolona. Este precursor é transportado para o retículo endoplasmático liso e, por ação da enzima b-hidroxiesteróide deidrogenase/∆5,∆4 isomerase-3β-HSD (3β-HSD), é convertido em P4 (NISWENDER, 1994). Assim, a produção de P4 no CL é caracterizada por um aumento na expressão das enzimas que convertem o colesterol em P4 (P450scc e 3β-HSD) e por um decréscimo na expressão das enzimas que convertem P4 em E2 (P450 17α-hidroxilase e P450 arom) (BERTAN et al., 2002)

São relatadas diferenças na habilidade de produção de P4 pelas células lúteas na presença de LH. Acredita-se que cerca de 80% da P4 produzida *in vivo* pelo CL de ovino venha de células lúteas grandes (NISWENDER et al., 1985). Estudos demonstraram que as células lúteas pequenas são mais responsivas aos efeitos estimulatórios do LH e as células grandes são mais sensíveis aos efeitos luteóliticos da PGF2α. A interação exata entre as células lúteas grandes e pequenas ainda não está clara (PATE, 1996).

O CL tem mecanismos bem delineados pelo qual o seu desenvolvimento, manutenção e regressão sejam eficazmente controlados, não só através da regulação hormonal, mas também pelo sistema vascular e imunológico (SHIRASUNA et al., 2012; MIYAMOTO et al., 2013). A vascularização adequada do CL permite seu desenvolvimento normal e sua capacidade de produzir P4 e os outros hormônios e peptídeos descritos acima (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). Paralelamente, o sistema imunológico contribui para a regulação da função ovariana. Em particular, os leucócitos e suas citocinas têm sido implicados na regulação da esteroidogênese, assim como na função vascular.

A cada ciclo estral, as células esteroidogênicas luteais sintetizam e liberam P4 na circulação sistêmica com o objetivo de iniciar um processo de quiescência na contratilidade do miométrio e propiciar o desenvolvimento glandular do endométrio. Essas modificações propiciam um meio ambiente uterino adequado para o desenvolvimento de um ou vários conceptos (embrião e membranas extra-embrionárias), dependendo da espécie. Na ausência da fertilização ou na incapacidade do concepto em sinalizar sua existência no útero é promovida a falência funcional e estrutural do CL, processo denominado de luteólise (BERTAN et al., 2002).

A luteólise consiste na perda da capacidade esteroidogênica (luteólise funcional) e na regressão morfológica (luteólise estrutural) do CL (MCCRACKEN et al., 1999). O mecanismo pelo qual se dá a luteólise é por meio da vasoconstricção dos vasos sanguíneos que suprem o CL causada pela PGF2α. No período médio do ciclo estral os folículos secretam E2, que estimula a síntese de receptores de OX no endométrio. O CL secreta OX que age sobre as células glandulares do endométrio e estimula a secreção de PGF2α. A PGF2α produzida no endométrio chega ao ovário através de um mecanismo de contra-corrente entre a veia, o vaso linfático uterino e artéria ovariana, desencadeando a luteólise. A OX liberada pela neuro-hipófise também age no processo de luteólise (FLINT & SHELDRICK, 1986). O CL em processo de regressão, também libera OX, alimentando ainda mais este mecanismo de *feedback* positivo. O útero é exposto à P4 e E2 por aproximadamente 10 dias, antes de tornar-se responsivo à OX (HOMANICS & SILVIA, 1988). A queda na concentração de P4 circulante também estimula a expressão de receptores de OX pelo endométrio (MANN et al., 2001). Com a queda da P4, o folículo pré-ovulatório consegue ovular dando início a um novo ciclo estral. Foi Babbock em 1966, o primeiro a sugerir que uma PG seria a substância secretada pelo útero que provocaria a luteólise. Mais tarde se comprovou que a injeção de PGF2α, em ratas, provocava uma marcada diminuição na P4 e que a PGF2α seria um fator luteolítico na ovelha (PATE & TOWNSON, 1994).

Caso o útero não seja sensibilizado pela P4 e E2 no ciclo anterior, a secreção uterina de OX é desenvolve-se prematuramente. Esta é a base da regressão prematura do CL, que é muito comum em ovelhas que iniciam o ciclo estral após o anestro estacional (HUNTER et al., 1986). A persistência espontânea do CL ocorre na ovelha com incidência de 2 a 3% (DUKES, SWENSON & REECE, 1993).

*2.2.2.1 Regressão Prematura do Corpo Lúteo (RPCL)*

A duração da fase luteal em ovinos pode estar alterada, em algumas situações, levando por consequência, à diminuição ou aumento do ciclo estral. Ciclos estrais longos são mais comuns no final da estação de acasalamento. Já os ciclos curtos concentram-se na estação de transição e início da estação de acasalamento (FONSECA, 2005). Cerca de 25 a 50% dos embriões de mamíferos são perdidos durante a gestação inicial. Grande parcela desta perda parece ser causada por inadequada função luteal.

Um evento comum em cabras e ovelhas é a regressão prematura do corpo lúteo (RPCL). Essa alteração na funcionalidade do corpo lúteo se caracteriza pela redução de sua longevidade e é evidente em torno de três a quatro dias após o início do estro (SAHARREA et al., 1998; OLIVEIRA E FELICIANO, 2013b). A evidência da RPCL é confirmada pela concentração de progesterona (P4) plasmática abaixo de 1 ng/mL (CERVANTES et al., 2007).

Considera-se RPCL a perda da função do corpo lúteo que acontece antes do momento em que o endométrio inicia fisiologicamente a secreção pulsátil de PGF2α em um ciclo estral (SÁ FILHO E VASCONCELOS, 2008).

Os fatores endócrinos aos quais o folículo é exposto antes da ovulação têm uma influência fundamental sobre a função adequada do CL (BAIRD, 1992). Segundo Armstrong etal. (1982), uma das prováveis causas da RPCL pode ser um desenvolvimento folicular muito rápido. Desta forma, ocorre a ovulação de folículos nos quais as células da granulosa não tenham adquirido uma maturidade necessária para uma luteinização ideal em resposta a onda de LH. Portanto, o fenômeno está associado à baixas concentrações de P4 entre o terceiro e sexto dia do ciclo estral e à deflagração precoce da cascata luteolítica (LASSOUED et al., 1997). É evidente cerca de quatro dias após o estro, mas as concentrações plasmáticas de P4 incompatíveis com a atividade luteal normal já são detectadas aos três dias após o estro em animais acometidos (SAHARREA et al., 1998).

Em ovelhas superovuladas observa-se grande frequência de RPCL (FONSECA, 2006). Okada et al. (2000) sugerem que esse fenômeno não ocorra por regressão luteal prematura de corpo lúteo funcionalmente competente, mas por formação de corpo lúteo anormal que apresenta “hipoplasia lútea” devido à luteinização inadequada. Esse corpo lúteo com luteinização inadequada teria tempo de vida menor (~ 3,5 dias após o estro). Entretanto, a causa e o modo como esse fenômeno ocorre não estão completamente esclarecidos e há divergências entre pesquisadores, sendo possível acontecer tanto a RPCL como a hipoplasia.

O tratamento hormonal fundamenta-se na prevenção da RPCL evitando-se a formação de CLs deficientes e garantindo uma fase luteal normal. Por outro lado, pode-se prevenir ou controlar a RPCL interferindo diretamente na cascata luteolítica (FAIRCLOUGH et al., 1976; COOKE & HOMEIDA, 1985) disparada pela liberação prematura de PGF2α. Isto pode ser obtido como uso de inibidores da síntese de PGF2α ou ainda promovendo a luteinização e/ou ovulação de folículos persistentes produtores de E2 logo após o estro. A administração de gonadotrofinas após o estro apresenta-se como outra possibilidade com o intuito de promover a luteinização ou ovulação de folículos persistentes (FONSECA, 2005)

2.3 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRÕES

2.3.1 Histórico da técnica e aplicações

Os primeiros relatos experimentais em embriologia de mamíferos foram realizados com coelhos, devido suas características biológicas favoráveis, como o tamanho relativamente grande do óvulo, facilitando assim a manipulação, e a ovulação induzida pelo acasalamento, fato de elevada conveniência para determinação precisa da idade dos embriões. Alguns desses trabalhos iniciais relatam estágios embrionários pré-implantacionais, que foram descritos em 1875 por Van Beneden, transferência de embriões para o oviduto, descritos em 1890 por Heape, entre outras observações. A primeira transferência de embriões em ovinos foi documentada por Warwick et al. (1934) nos Estados Unidos. Já no Brasil, o primeiro relato foi feito por Selaive & Mies Filho (1979) com o nascimento de três borregos oriundos de transferência de embriões a fresco no Rio Grande do Sul. Atualmente, pode-se afirmar que a transferência de embriões em ovelhas é uma realidade. Entretanto, a ausência de controles oficiais e de comunicações de profissionais e associações inviabiliza o conhecimento dos dados oficiais de ocorrência da técnica.

Os programas de MOTE possibilitam que uma fêmea produza um número de proles que não seria possível obterem fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Desta forma, a utilização de fêmeas geneticamente superiores como doadoras de embriões permite a multiplicação deste potencial, sendo uma ferramenta essencial para acelerar e maximizar os processos de seleção e melhoramento animal. O congelamento dos embriões possibilita a importação e exportação de embriões. A técnica permite ainda a reprodução de fêmeas idosas que não conseguem manter a gestação, o controle de doenças infecciosas, auxilia nos testes de progênie permitindo em um curto espaço de tempo avaliar a capacidade de uma determinada matriz em transferir características desejáveis para suas proles, possibilitam trabalhos na engenharia genética como sexagem de embriões e clonagem (GONZALES e OLIVEIRA, 1992).

2.3.2 Descrição da técnica

Sucintamente, os programas de MOTE baseiam-se na seleção doa animais, indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da monta natural ou inseminação artificial, colheita dos embriões por meio de lavagem uterina e posterior transferência (inovulação) dos embriões a fêmeas receptoras (REICHENBACH et al., 2002).

*2.3.2.1. Seleção de doadoras e receptoras*

A seleção de doadoras deve ser feita de forma rigorosa, pois, problemas de ordem nutricional ou sanitário influenciam o resultado. Além do potencial genético e zootécnico, a avaliação clínico-ginecológica é recomendada no processo de seleção de fêmeas doadoras de embriões. As doadoras e receptoras, sempre que possível, deverão ser manejadas nas mesmas instalações; objetivando, dentre outros aspectos, facilitar o manejo dos animais, favorecer a execução das diferentes etapas inerentes a transferência de embrião e minimizar custos (FREITAS, 2002). As doadoras selecionadas para o programa devem apresentar fertilidade comprovada e progênie que tenha produção compatível com uma média de destaque, fenótipo que se enquadra nos padrões de qualidade desejáveis. Ovelhas jovens (nulíparas) também podem ser submetidas à coleta não cirúrgica, mas a recomendação é que sejam utilizadas fêmeas primíparas ou pluríparas, especialmente em ovelhas, em função da maior dificuldade de transposição da cérvix.

A escolha da fêmea que se portará como receptora é tão importante quanto a seleção da doadora de embriões, visto que a mesma deve apresentar boas condições para levar a gestação até final. Alguns critérios devem ser avaliados para seleção das receptoras, como: devem apresentar cios regulares, em média a cada 21 dias; encontrar-se em um bom estado nutricional e sanitário; livres de doenças do sistema reprodutor; boa habilidade materna, isto é, não serem predispostas a rejeição da cria; boa aptidão leiteira, ou seja, capazes de alimentar e criar os produtos (OLIVEIRA e GONZALES, 1992). As receptoras são fêmeas que deverão assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento embrionários sendo seus valores genéticos pouco importantes (SANTANA, 1994). Devem ter idade de no mínimo sete meses e pesar entre 30 a 35 kg. As uníparas são bem recomendadas, pois os resultados de fertilidade obtidos são superiores, em torno de 10% sobre as pluríparas (SANTANA, 1994). É fundamental que os animais selecionados se integrem ao rebanho, ou sejam transferidos para um mesmo local, pelo menos três meses antes do início do tratamento hormonal sendo necessário para um período de boa adaptação.

*2.3.2.2. Sincronização de estro e superovulação*

O procedimento superovulatório pode ser realizado com base na observação de estro natural ou após a sincronização de estro. Entretanto, sabe-se que o resultado satisfatório no programa de MOTE depende entre outros aspectos da sincronização adequada do ciclo estral entre a doadora e a(s) receptora(s). Para que se obtenha uma alta percentagem de gestações é necessário que a receptora esteja em estro simultaneamente ou com diferença aproximada de um dia em relação a doadora (POTES, 1990). Métodos bem-sucedidos não apenas precisam estabelecer uma sincronia do estro, mas também proporcionar um nível aceitável de fertilidade, tanto na utilização da IA, como na monta natural (WILDEUS, 1999). Sendo assim, tradicionalmente em pequenos ruminantes, a sincronização é conseguida através da redução do comprimento da fase luteal do ciclo estral com o uso da prostaglandina F2α (PGF) ou seus análogos sintéticos e/ou estendendo o ciclo artificialmente com progesterona exógena ou progestágenos (EVANS & MAXWELL, 1987; KUSINA et al., 2000; JAIUNUDEEN et al., 2000).

As prostaglandinas são compostos extremamente potentes que desencadeiam uma ampla faixa de respostas fisiológicas. Na reprodução, estão envolvidas na liberação de gonadotrofinas, nos processos de ovulação, luteólise, parto, pós-parto, gestação e transporte de gametas. Um novo ciclo estral é iniciado quando o protocolo a base de PGF2a promove a sincronização do estro induzindo a regressão do CL por meio da interrupção da fase luteal do ciclo (HERRERA et al., 1990). Os agentes luteolíticos mais utilizados são os análogos sintéticos da PGF2α, como por exemplo, o cloprostenol. O cloprostenol possui a mesma estrutura geral da PGF2α e um peso molecular de 414,5 Kd, tendo uma meia-vida em torno de 3 h (FREITAS & LOPES JUNIOR, 2002). É 100 vezes mais potente que a PGF2α (natural), tem meia-vida mais longa, e demonstra maior seletividade para os receptores do CL que a PGF2α (DUKES et al., 1974; FIERO et al., 2013). Existem no mercado duas apresentações de cloprostenol: DL cloprostenol (mistura racêmica) e D-cloprostenol, sendo este último 10 vezes mais potente que o primeiro, necessitando de doses menores (FIERRO et al., 2013). Doses entre 50 µg e 125 µg são efetivas em promover luteólise e sincronizar o estro em ovinos. O CL ovino é responsivo à aplicação de PGF2α a partir do terceiro dia do ciclo estral, considerando o D0 como dia da ovulação.

Quanto aos progestágenos/progesterona, são utilizados dispositivos vaginais ou implantes auriculares. Os mais comumente utilizados em pequenos ruminantes é o *Controlled Internal Drug Release* (CIDR; 0,3 g de progesterona) ou progestágenos, como o acetato de flurogestona (FGA; 45 mg) e acetato de medroxiprogesterona (MAP; 60 mg). Estes dispositivos permanecem por um tempo de exposição superior a 10 dias para a indução e sincronização do estro. O mais comum é que em ovelhas o progestágeno permaneça por 14 dias (i.e., período de duração da fase lútea).

Programas de superovulação em ovinos, assim como em outras espécies domésticas, consistem na administração de altas doses de gonadotrofinas, visando induzir ovulações múltiplas e obter o maior número possível de embriões viáveis por ciclo, os quais poderão produzir gestações (VEIGA-LOPEZ, et al., 2008; OLIVEIRA, 2011). Considera-se que um protocolo de superovulação foi bem-sucedido quando ocorrem mais ovulações do que o normal, para uma determinada raça, em relação ao número de ovulações em condições de ciclo estral natural (SIMONETTI et al., 2008). Nesses protocolos a base de progestágenos, as administrações de gonadotrofinas exógenas iniciam-se dois dias antes do término do período progesterônico, administrado em doses decrescentes, durante dois a quatro dias (FONSECA et al., 2007). Entretanto, estes tratamentos tradicionais foram definidos há vários anos e não consideravam os conhecimentos atuais do desenvolvimento folicular (MENCHACA et al., 2010), sendo atualmente relacionados inúmeros efeitos adversos.

Recomenda-se o emprego de FSH em seis a oito aplicações. Em geral, o FSH exógeno começa a atuar sobre a população de folículos presente nos ovários das ovelhas entre 12 e 24 horas após o início do tratamento. Decorridas 48 horas, se observa crescimento de folículos de 2 a 5 mm. Os folículos em crescimento alcançam o tamanho pré-ovulatório entre 36 e 60 horas, concentrando-se entre 48 e 60 horas o processo ovulatório (GONZÁLEZ-BULNES et al., 1997). A dose total utilizada é relativamente elevada, com cerca de 200 a 256 mg de FSH (Folltropin®; FONSECA et al., 2007).

Apesar dos benefícios da sincronização, atribui-se aos progestágenos efeito negativo ao número de ovulações e embriões transferíveis. Estratégias usadas, para atenuar o efeito negativo dos tratamentos com progestágenos incluem: (1) troca do dispositivo de progesterona na metade do protocolo; (2) suplementação de gonadotrofinas logo após a remoção do dispositivo até a ovulação para evitar efeito nocivo do folículo dominante; (3) administrar tratamento superovulatório baseando-se na detecção do estro natural (início das administrações de gonadotrofinas quatro dias após o estro); ou (4) encurtar o período do tratamento com progestágenos para cinco a sete dias (OLIVEIRA, 2011b).

A grande problemática que tem intensificado as pesquisas relacionada a MOTE é referente à ampla variabilidade das respostas superovulatórias aos tratamentos gonadotróficos. Os resultados dos tratamentos superovulatórios em ovinos ainda apresentam alto grau de variabilidade em relação à taxa de ovulação e de recuperação de embriões (COGNIÉ, 1999; FONSECA, 2005), sendo considerado como a maior limitação dos programas de reprodução assistida (HARESIGN, 1992; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003; OLIVEIRA, 2011). Sabe-se que a variabilidade da resposta de cada fêmea ao tratamento gonadotrófico deve-se, principalmente, à variação na resposta folicular (OLIVEIRA et al., 2012). A eficiência do protocolo de sincronização (ARASHIRO et al., 2009), o perfil de progesterona induzido pelo dispositivo utilizado no tratamento, o protocolo de superovulação utilizado (ARMSTRONG & EVANS, 1983), a dose de gonadotrofina utilizada e a condição folicular no início do tratamento superovulatório (RUBIANES et al., 1995; RUBIANES et al., 1997; VARAGO et al., 2009) são fatores que interferem na resposta superovulatória dos ovinos.

A assincronia ovariana em relação à fase na qual se encontra a onda folicular no início do tratamento com gonadotrofinas, marcada pela presença de folículos maiores que 5-6 mm de diâmetro no início da superovulação (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002c; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002d; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008), é um dos principais fatores que contribuem para essa variabilidade. Os folículos ovulatórios, em ovelhas superovuladas, são derivados dos pequenos folículos antrais presentes no início do tratamento superovulatório com FSH (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002a; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003). Com isso, os mesmos autores sugerem que a grande variação na população de folículos antrais, entre animais, poderia explicar a ocorrência da variação individual da resposta à superovulação, em relação à taxa de ovulação e à produção de embriões.

Tratamentos superovulatórios iniciados na ausência de um folículo dominante garantem uma boa resposta ovulatória, de acordo com os padrões de ovulação da espécie (ARMSTRONG, 1993; DRIANCOURT, 2001), resultando em melhores taxas de recrutamento folicular, de ovulação e de produção de embriões (RUBIANES et al., 1995; RUBIANES et al., 1997). Dessa forma, a resposta ao tratamento superovulatório é aumentada, significativamente, quando o mesmo é aplicado no momento da emergência da onda folicular. Por outro lado, quando este se inicia um dia após a emergência da onda, há redução da resposta ao FSH (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002c).

Nos tratamentos tradicionais, 70-85% das doadoras apresentam grandes folículos dominantes ao início dos tratamentos com FSH (MENCHACA et al., 2007). Considerando a imprevisibilidade do dia da emergência de cada onda folicular em ovinos, a questão é como sincronizá-la (MENCHACA et al., 2010). Dentre os métodos para sincronizar a emergência da onda folicular, o estro e induzir a ovulação, a aplicação de esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos tem sido amplamente utilizada em ovelhas e cabras, antes do início da superovulação, demonstrando bons resultados em relação ao percentual de animais em estro, à sincronia e à fertilidade (SIMPLÍCIO, FREITAS, & FONSECA, 2007; URIBE-VELÁSQUEZ, CADAVID, OSORIO, 2009). O uso destes implantes para sincronização da onda folicular, antes do início do tratamento superovulatório, aumentou a indução do estro e proporcionou uma melhor resposta superovulatória (RUBIANES et al., 1995).

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

Com base nisso, no “protocolo do dia zero” o tratamento com FSH é iniciado após a detecção ultrassonográfica da ovulação ou a partir do momento em que se espera que ela ocorra (dia 0), podendo ser 36 horas após o início do estro ou 48 horas após a aplicação do protocolo de curta duração utilizado para sincronização do cio base (RUBIANES & MENCHACA, 2006). Para garantir a luteólise, aplica-se PGF2α ao final do “protocolo do dia 0”. O uso deste tratamento resultou em melhores taxas de ovulação (13,5 ± 1,4) e de recuperação de embriões (7,9 ± 1,4) em ovelhas da raça Merino, quando comparado a outro protocolo de sincronização longo (14 dias) com progesterona (troca do CIDR no dia 7) e aplicação de PGF2α no momento da troca do CIDR, seguido da superovulação com FSH 48 horas antes do término do tratamento com progesterona (RUBIANES & MENCHACA, 2006).

Outra estratégia, comumente empregada em bovinos, é a indução de uma nova onda folicular pelo emprego de estrógenos associado ao progestágeno (BÓ et al., 1995). Entretanto, poucos estudos têm avaliado este tratamento em ovinos e caprinos (MENCHACA et al., 2010). Os dois fármacos conjuntamente promovem supressão das concentrações de FSH e regressão dos folículos dominantes em ovelhas durante anestro (BARRETT et al., 2008). Uma nova onda de FSH e emergência da onda folicular ocorreu, aproximadamente, três a cinco dias após o tratamento com o estrógeno (BARRETT et al., 2008; BARTLEWSKI et al., 2008). Nestes estudos, o 17􀈕-estradiol foi administrado por volta da metade do tratamento (14 dias) com progestágeno, resultando em uma redução da variabilidade da resposta ovariana, sem, no entanto, afetar a produção embrionária (OLIVEIRA, 2011b).

*2.3.2.3. Acasalamento*

O acasalamento das fêmeas doadoras de embriões pode ser feito por monta natural, livre ou controlada; inseminação artificial (IA) seguida da detecção de estro; ou ainda inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A variabilidade no momento das ovulações é um fator limitante para se obter uma elevada taxa de fecundação e torna-se particularmente crítico quando do uso de IA com sêmen congelado (FREITAS & SIMPLÍCIO, 2002). Tanto na IA como na monta natural, recomenda-se realizar de duas a três repetições intervaladas de 12 horas (FONSECA, 2005). A necessidade de repetições desses procedimentos faz-se necessário devido à assincronia entre as ovulações de folículos de um mesmo animal e entre fêmeas. A IA realizada em função do início do estro apresenta maior taxa de fecundação comparada a IATF (VALLET & BARIL, 1990).

*2.3.2.4. Coleta dos embriões, busca e seleção*

A resposta superovulatória deve ser avaliada pelo menos um dia antes da lavagem uterina, por meio da ultrassonografia transretal. A recuperação de embriões deve ser feita seis a sete dias após a primeira inseminação artificial ou monta natural, respectivamente. Na ovelha, um fator que limita a utilização da TE em escala comercial é a dificuldade de serem realizadas colheitas de embriões transcervical, devido a anatomia da cérvix, já que este é longa, sinuosa, com abertura dos anéis de forma excêntrica e com diâmetro reduzido. O orifício externo apresenta diferentes formatos em bico de pato, *flap*, roseta e espiral (HALBERT et al., 1990b; SILVA et al., 2004), dificultando assim à passagem de instrumentos que permitam o acesso ao útero pela via transcervical. Com isso, a utilização comercial dessas biotécnicas fica limitada aos procedimentos cirúrgicos e laparoscópicos, onde ficam expostas a possíveis aderências do sistema genital das doadoras, reduzindo o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea e, podendo muitas vezes comprometer a vida reprodutiva futura do animal (GONZÁLES et al., 1991, 2004; MAYORGA et al., 2011). Estudos indicam que a transposição da barreira transcervical estão relacionadas a alguns fatores, como a raça, o número de partos ocorridos anteriormente à colheita, bem como de fatores inerentes ao indivíduo (ALMEIDA et al., 2002).

A colheita de embriões através do lavado uterino é realizada por método cirúrgico com exposição do útero, onde a ovelha e anestesiada. Após tricotomia e assepsia da região pré-mamária do abdômen, administra-se lidocaína a 1%, pela via subcutânea, no ponto de introdução de um trocarter que vai dar acesso à ótica com fonte de luz e permitir a visualização do interior da cavidade abdominal e no ponto onde se faz uma abertura que permite a introdução da pinça modelo Babecock. Os pontos de anestesia local são feitos na linha das tetas. Visualmente, faz-se a avaliação da presença e da qualidade do copo lúteo (CL). Posteriormente, é feita a exteriorização do corno uterino e assim realizada a colheita. O desenvolvimento da técnica não cirúrgica de coleta de embriões amplia as possibilidades de emprego dos programas de MOTE, visto que reduz a ocorrência de complicações futuras para as fêmeas.

Após a colheita, o tubo ou placa deve ser enviada ao laboratório. As estruturas recuperadas são triadas sob estereomicroscópio e classificadas. A classificação dos embriões de ovinos segue o mesmo padrão descrito para bovinos, de acordo com o método relatado por Lindner e Wright (1983) e baseado nas normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

*2.3.2.5. Criopreservação*

A criopreservação surge como ferramenta valiosa para otimizar e multiplicar a produção de embriões com alto valor genético. O princípio fundamental do processo de criopreservação é baseado na necessidade de remoção máximo de água intracelular antes da criopreservação, para que não ocorra a formação de grandes cristais de gelo e danos celulares, possibilitando a retomada do metabolismo celular após seu armazenamento em baixas temperaturas (VAJTA E KUWAYMA, 2006).

A congelação lenta e a vitrificação são os métodos comumente utilizados para criopreservação de embriões na espécie ovina.

A congelação lenta, método conhecido como tradicional, congelação clássica ou de equilíbrio, consiste na tentativa de criar um delicado balanço entre vários fatores que determinam a formação de cristais de gelo, fraturas danos tóxicos e osmóticos, permitindo trocas entre os meios extra e intracelular sem que ocorram sérios efeitos osmóticos e deformidades celulares (VAJTA E KUWAYMA, 2006).

Antes de se submeter os embriões a queda de temperatura, faz-se necessário a utilização de solução crioprotetora. Estudos recentes mostram a superioridade do etilenoglicol nesse processo. As taxas de sobrevivência de embriões de ovinos congelados em etilenoglicol apresentam sobrevivência de 66,1%, sendo que, ao serem coletados no estagio de blastocisto, alcançam taxas de eclosão de ate 83,7% (GARCIA-GARCIA et al., 2005).

Congelados em etilenoglicol, embriões colhetados em estagio de 2-12 células até mórulas (GARCIA-GARCIA et al, 2006) atingiram taxa de sobrevivência *in vitro* de 26,1%, enquanto embriões colhetados e congelados em fase de blastocisto tiveram taxa de 83,7%, mostrando que o efeito da congelação não foi significativo, pois não ouve diferença em comparação a sobrevivência in vitro dos embriões frescos colhidos na fase de blastocisto (92,5%). Outro estudo com embriões ovinos congelados em etilenoglicol pelo método lento, obteve taxas de prenhes de 73%, enquanto a implantação de embrioes frescos atingiu taxa similar, com 74% de gestação (MCGINNIS et al.,1993).

A vitrificação de embriões ovinos PIVE em etilenoglicol e glicerol tem se mostrado satisfatória, chegando a taxas de 70% e 50% de sobrevivência embrionária e gestação, respectivamente. (DATTENA et al., 2000; MARTINEZ et al. 2006). Dattena et al. (2004) obtiveram taxas de prenhez de 57% e 50%, respectivamente, com o uso de etilenoglicol e glicerol ou etilenoglicol, DMSO e sacarose na vitrificação de embriões PIVE, sem diferença significativa entre os dois grupos. No mesmo estudo, ao vitrificarem embriões produzidos in vitro, os autores observaram que as taxas de prenhez não diferiram entre si, alcançando 75 e 71% respectivamente.

Resultados estatísticos mostram que a vitrificação, quando comparada ao método de congelação lenta, têm resultados análogos na criopreservação de embriões de ovinos, ressaltando-se a eficiência do uso do etilenoglicol como crioprotetor de embriões nos estádios de mórula e blastocisto (GARCIA-GARCIA et al, 2006).

Ressalta-se ainda que as taxas de reaquecimento também influenciem a viabilidade celular e dependem das condições em que foi realizada a criopreservação. Além disso, o resultado obtido do processo de descongelação depende também da reidratação celular e da remoção do crioprotetor, momento em que o espécimo já se encontra em temperatura fisiológica ( WOODS et al, 2004).

Especial cuidado faz-se necessário no reaquecimento visando minimizar os danos celulares e contribuir para que ocorra maior regeneração embrionária após o reaquecimento.

2.3.3 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO QUANTI-QUALITATIVA DE EMBRIÕES

Ainda se encontra uma grande variação na taxa de ovulação e no número de embriões viáveis recuperados entre os tratamentos e entre os animais dentro de um mesmo tratamento de superovulação (DRIANCOURT, 1991; COGNIÉ, 1999; BALDASSARE, 2008). González-Bulnes et al. (2000) relataram que este é um problema pertinente à ordem de 20 a 30% das fêmeas tratadas. Esta variabilidade tem sido associada a fatores extrínsecos e intrínsecos (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003).

Entre os fatores extrínsecos que têm maior influência na resposta superovulatória, encontram-se: origem e pureza da gonadotrofina utilizada e protocolo de administração dessa gonadotrofina, (BARIL et al., 1996), as variações de temperatura e umidade relativa do ar (VARAGO, 2009). Com relação aos fatores intrínsecos, destacam-se: raça, fatores genéticos, idade, nutrição, status reprodutivo das doadoras (SANTOS et al., 2009), deficiência ou inexistência do pico de LH (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003), a presença de folículos não responsivos, durante a regulação dos receptores de LH nas células da teca e da granulosa (BOLAND et al., 1991; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003), momento do acasalamento e o número de serviços. Como mencionado anteriormente, recentemente, ficou constatado que a população folicular presente nos ovários no início do tratamento hormonal é um fator que possui grande participação na resposta à superovulação (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2005; VEIGA-LOPES et al., 2005).

Essa variação na resposta superovulatória ocorre independentemente do tipo de hormônio utilizado, do sistema de acasalamento, da dose de progesterona utilizada ou do método de colheita dos embriões (ARMSTRONG & EVANS, 1983; BARI et al., 2000; BARI et al., 2001). A raça do animal é outro fator que pode influenciar na resposta das fêmeas em relação à taxa de ovulação em programas de superovulação. Segundo Armstrong e Evans (1983), ovelhas da raça *Merino* e *Suffolk* apresentam maior taxa de ovulação (16,6 ± 3,7 e 11,3 ± 0,9, respectivamente) quando comparadas com ovelhas da raça *Romney Marsh* (8,2 ± 2,0), após protocolos de superovulação utilizando FSH e eCG. Ovelhas da raça Santa Inês apresentaram médias entre 9-13 ovulações após superovulação com FSH (CORDEIRO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2012). Porém, observa-se uma grande variação nas taxas de ovulação entre as fêmeas de uma mesma raça (OLIVEIRA et al., 2012).

Outro fator extremamente importante que pode afetar a resposta superovulatória e comprometer a produção de embriões é a RPCL (RUBIANES et al., 1995; OLIVEIRA, 2011), já descrita anteriormente. A RPCL é comum em ovelhas, principalmente em fêmeas superovuladas. Este evento se caracteriza pelo desencadeamento precoce da cascata luteolítica e, em ovelhas superovuladas, está associado à baixas concentrações de progesterona entre o terceiro e o sexto dia do ciclo estral (LASSOUED et al., 1997) e a RPCL é evidente aproximadamente quatro dias após o estro. Outro mecanismo que pode estar envolvido com a ocorrência de RPCL é a presença de folículos persistentes. Altas doses de FSH ou eCG, nos protocolos de superovulação, podem induzir a um estímulo prolongado sobre os folículos não ovulados, os quais permanecem produzindo estrógeno, levando à persistência de elevadas concentrações deste hormônio durante a fase lútea inicial. A alta concentração de estrógeno está associada com a liberação precoce de PGF2α e regressão luteal (OKADA et al., 2000; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008).

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

**3. OBJETIVOS**

3.1 Geral

Desenvolver protocolo eficiente de sincronização da onda de crescimento folicular em ovelhas da raça Santa Inês, visando posterior tratamento superovulatório e colheita de embriões.

* 1. Específicos

Avaliar o efeito da administração do benzoato de estradiol e do GnRH sozinhos ou em associação sobre o momento do surgimento e a sincronia de nova onda de crescimento folicular em ovelhas;

Avaliar o desempenho do melhor protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular em um protocolo tradicional para produção in vivo de embriões em ovelhas;

Identificar a eficiência de produção de embriões nos distintos protocolos de sincronização e superovulação propostos;

Verificar se os protocolos de sincronização e superovulação propostos afetam as taxas de recuperação embrionária e de regressão precoce do corpo lúteo.

**4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense sob o número 452/13.

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro, foram avaliadas quatro associações farmacológicas com intuito de sincronizar a onda de crescimento folicular visando a produção *in vivo* de embriões. A partir do primeiro experimento, foi determinado o protocolo que promoveu a melhor sincronização da emergência da onda folicular e este foi aplicado em um protocolo de superovulação com posterior colheita de embriões, constituindo o segundo experimento.

4.2 LOCALIZAÇÃO E PERÍODO EXPERIMENTAL

Ambos os experimentos foram conduzidos na Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UniPECO) localizado na Fazenda Escola da Universidade Federal Fluminense, no município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro (22° 27’ latitude sul, 43° 39’ longitude oeste). Segundo a classificação Koppen, 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 2.600 mm3. Este estudo foi conduzido durante os meses de agosto de 2015 a abril de 2016.

4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

**4.3.1 Ovelhas**

No primeiro experimento, foram utilizadas 66 ovelhas da raça Santa Inês (Tabela 1), enquanto no segundo foram utilizadas 22 fêmeas da mesma raça (Tabela 2). Todos os animais passaram por avaliação clínica e reprodutiva por meio de exame ultrassonográfico prévio objetivando diagnosticar qualquer anormalidade, a fim de selecionar fêmeas hígidas.

Durante o experimento, que teve duração de 16 dias no primeiro experimento (realizado em três etapas) e 17 dias no segundo experimento, todos os animais foram mantidos em sistema de confinamento em baias com ripado suspenso. Foi realizada uma adaptação prévia dos animais às instalações e ao manejo alimentar durante 10 dias. A alimentação consistiu no fornecimento de capim picado e. Os animais recebiam concentrado contendo 12% de proteína e 70% de NDT. Os animais receberam sal mineral (Sal Minas Ovinos, Nutriplan, Juiz de Fora) e água potável *ad libitum*.

Todas as fêmeas passaram por avaliação do peso e do escore da condição corporal (ECC). Para tal, as fêmeas foram pesadas em balança própria. Logo em seguida, foi avaliado o ECC pela palpação da região das costelas, do esterno e dos processos espinhosos e transversos da região lombar. A partir da obtenção destes dados, foram escolhidas fêmeas com ECC entre 2,5 e 3,5. No primeiro experimento, as fêmeas foram divididas nos grupos experimentais de acordo com a idade, categoria reprodutiva, peso e ECC (Tabela 1).

Tabela 1. Número de fêmeas, idade, peso (kg) e escore da condição corporal (ECC) de ovelhas da raça Santa Inês submetidas à sincronização da onda de crescimento folicular (média ± EPM)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Grupos** | **n\*** | **Idade (anos)** | **Peso corporal** | **ECC\*\*** |
| Gcontrole | 15 | 3,4 ± 0,3 | 44,4 ± 1,6 | 2,9 ± 0,1 |
| GBE | 18 | 3,2 ± 0,3 | 45,7 ± 1,0 | 2,8 ± 0,1 |
| GGnRH | 16 | 3,3 ± 0,4 | 45,1 ± 1,3 | 2,9 ± 0,1 |
| GBE+GnRH | 17 | 3,2 ± 0,3 | 42,6 ± 1,4 | 2,9 ± 0,1 |

\*n: Número de ovelhas em cada tratamento; \*\* Escala de 1 (muito magra) a 5 (muito gorda).

Na Tabela 2 são apresentados os valores de peso e ECC dos animais utilizados para a produção in vivo de embriões (Experimento 2), os animais do grupo controle apresentavam média de idade de doze meses, enquanto os animais do grupo teste apresentavam media de dezoito meses de idade.

Tabela 2. Número de fêmeas, idade, peso (kg) e escore da condição corporal (ECC) de ovelhas submetidas à sincronização da onda de crescimento folicular e posterior superovulação (média ± EPM)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Grupos** | **n\*** |  | **Peso corporal** | **ECC\*\*** |
| Gcontrole | 12 |  | 40,8 ± 1,2 | 2,8 ± 0,1 |
| Gteste | 10 |  | 33,1 ± 1,4 | 1,9 ± 0,1 |

\*n: Número de ovelhas em cada tratamento; \*\* Escala de 1 (muito magra) a 5 (muito gorda).

**4.3.2 Carneiros**

No Experimento 2, foram utilizados três carneiros da raça Santa Inês para acasalar com as fêmeas em estro. Previamente, foi realizado exame andrológico nos carneiros, obedecendo as normas do manual do CBRA e todos foram considerados aptos como reprodutores.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No Experimento 1, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais. Todas as fêmeas receberam implante intravaginal impregnado com progesterona (0,33 mg de progesterona – Eazi-Breed CIDR®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, São Paulo, Brasil), que permaneceram por até oito dias. Em cada fêmea, o implante era retirado no momento da detecção de uma onda folicular completa (recrutamento, seleção e dominância, com folículo ≥ 5 mm). No momento da inserção do dispositivo (Dia 0), em todas as fêmeas, administrou-se 0,24 mg de prostaglandina sintética i.m. (cloprostenol sódico - Estron®, Agener, Brasil). Ainda no Dia 0, o GBE (n=11) recebeu 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (RIC-BE®, Agener, Brasil), em GGnRH (n=16), as fêmeas receberam 0,025 mg de lecirelina i.m. (Gestran Plus®, Agener, Brasil); no GBE+GnRH (n=14), foram associados 2 mg de benzoato e 0,025 mg de lecirelina e, finalmente, no Gcontrole (n=14), as ovelhas não receberam tratamento adicional além da progesterona e prostaglandina sintética (Figura 1).

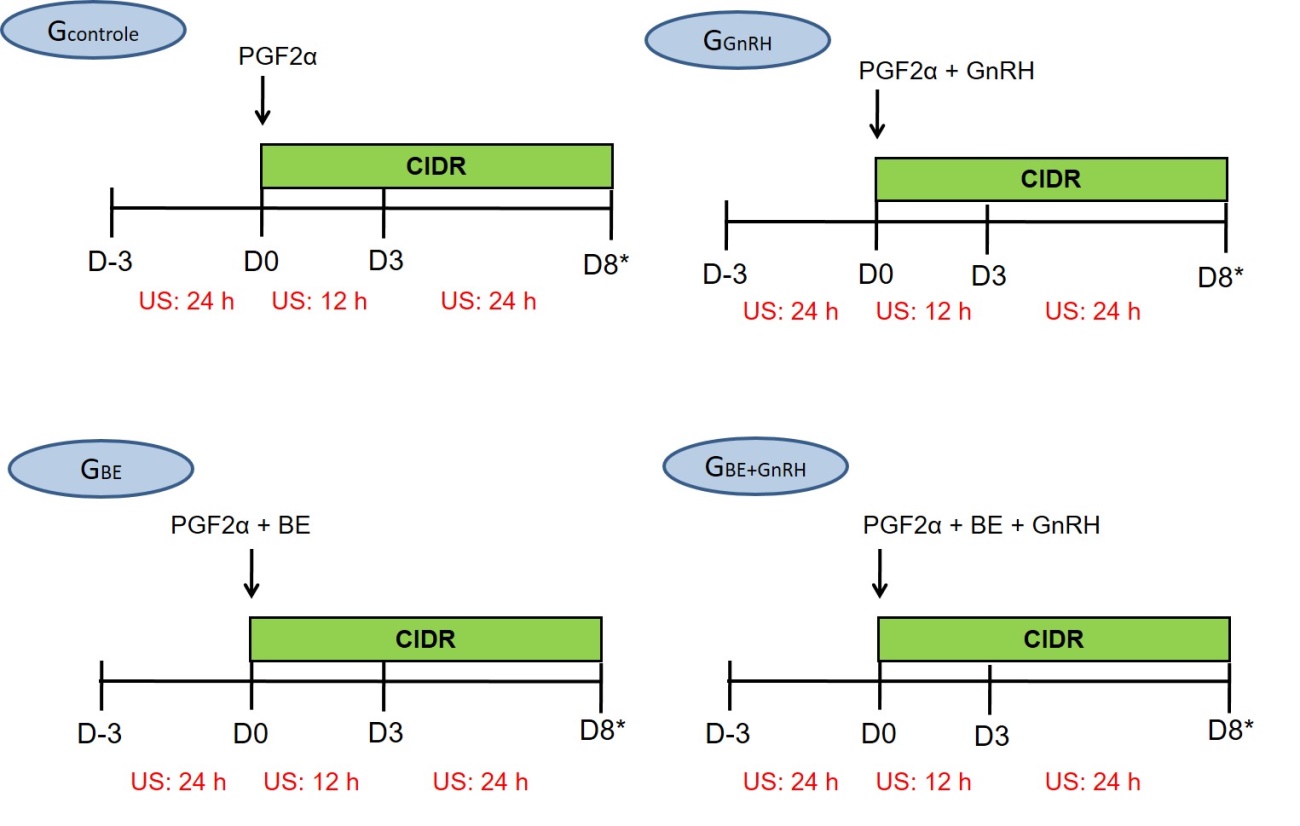


Figura 1. Protocolos hormonais testados no Experimento 1, para a sincronização de onda folicular, considerando Dia 0, como o dia da colocação do dispositivo e aplicação dos demais hormônios. Exames Ultrassonográficos (US) foram realizados a cada 24 h nos três dias anteriores à colocação do dispositivo e a cada 12 h até o momento da detecção de uma onda folicular completa (recrutamento, seleção e dominância, com folículo ≥ 5 mm), sendo considerado como máximo o período de oito dias para a permanência do dispositivo.

No Experimento 2, os animais foram divididos em dois tratamentos: Gcontrole e Gteste. No Gcontrole, foi utilizado o protocolo descrito por Balaro et al. (2016) para a sincronização da onda folicular. Sendo este constituído pelo uso do implante intravaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Campinas, SP, Brasil) mantido por seis dias. Às 24 h antes da remoção do implante, aplicou-se 300 UI de eCG (Novormon®, Schering Plough, São Paulo, Brasil) e 0,24 mg de cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). Às 36 h após a remoção da esponja, os animais receberam 25 µg de lecirelina (Gestran Plus®, Tecnopec, São Paulo-SP, Brasil). A superovulação iniciou 80 h após a retirada da esponja. Para o tratamento superovulatório, em ambos os grupos, foi utilizada uma dose de 200 mg de FSHp por fêmea i.m. (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá), administrado em seis doses decrescentes (25%/25%, 15%/15% e 10%/10%), com intervalo de 12 h entre as doses. Na última dose de FSH, aplicou-se 0,24 mg de cloprostenol (Estron®). Na primeira dose de FSH, uma nova esponja (Progespon®) foi inserida e removida na penúltima dose deste hormônio, i.e., a esponja permaneceu por 2,5 dias. Finalmente, 24 h após a última dose de FSH, 25 µg de lecirelina (Gestran Plus®) foi administrado. Após a última dose de FSH realizou-se monta natural controlada a cada 12 h até o final do estro (Figura 2A).

No Gteste, os animais receberam o mesmo tratamento descrito anteriormente referente ao grupo controle do Experimento 1. No Gteste, o implante de progesterona (CIDR®) permaneceu por 4,5 dias. No dia da colocação do implante, foi administrado 0,24 mg de cloprostenol sódico i.m. (Estron®) e a superovulação iniciou 56 h após a inserção. Como descrito anteriormente, o tratamento superovulatório foi administrado na mesma dose e sequência de aplicação que o Gcontrole. Desta forma, o implante foi removido na penúltima dose do FSH. Na última dose de FSH, aplicou-se 0,24 mg de cloprostenol (Estron®). Finalmente, 24 h após a última dose de FSH, 25 µg de lecirelina (Gestran Plus®) foi administrado. Após a última dose de FSH realizou-se monta natural controlada a cada 12 h até o final do estro (Figura 2B).

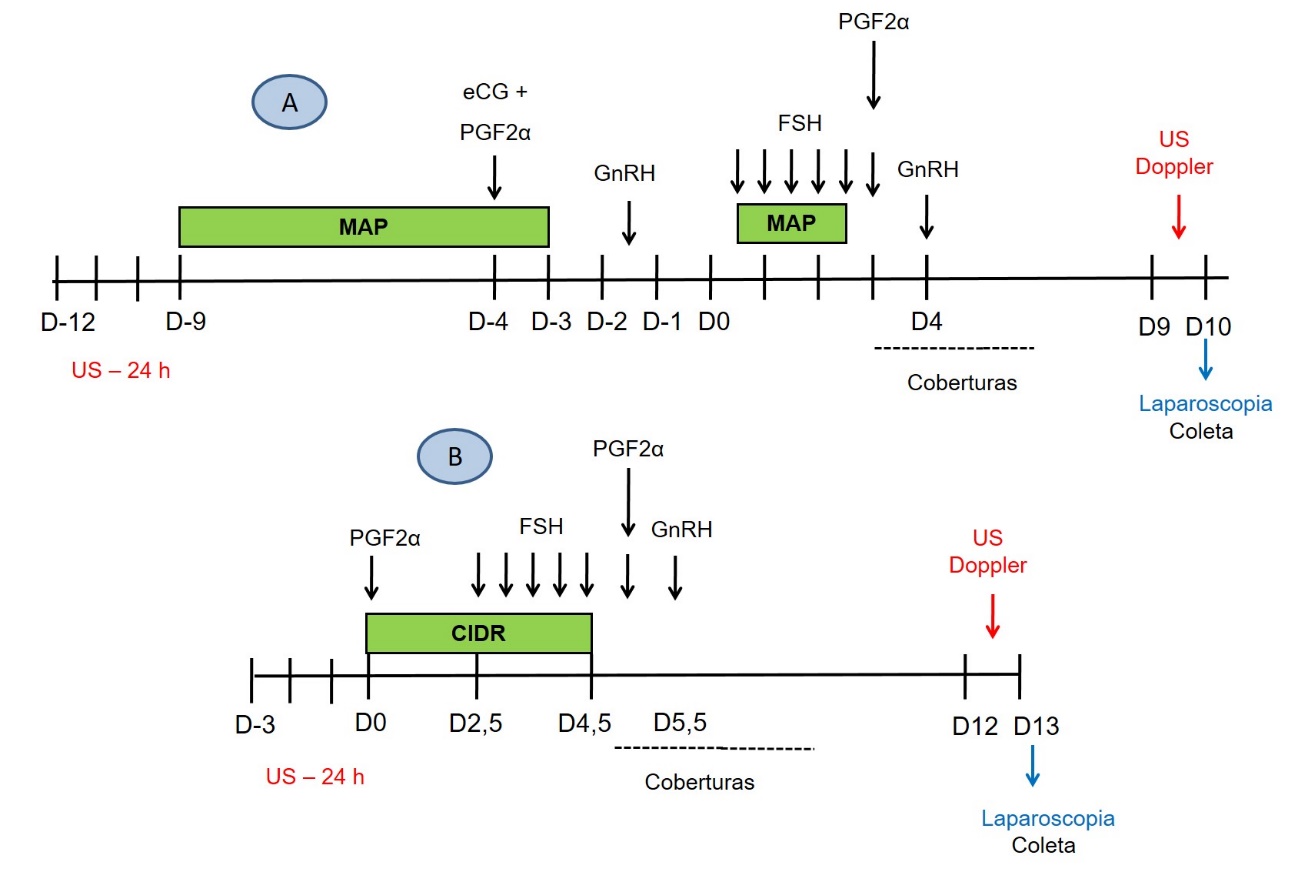


Figura 2. Representação esquemática dos grupos experimentais controle (A) e tratado (B) do Experimento 2. Exames Ultrassonográficos (US) foram realizados a cada 24 h nos três dias anteriores à colocação do dispositivo.

4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL E ACASALAMENTO

No Experimento 2, as ovelhas foram acasaladas por meio de monta controlada, por três dias seguidos, duas vezes ao dia, iniciando as 12 h após a última dose de FSH (Figura 2). As ovelhas eram soltas uma de cada vez com o carneiro em um cercado, onde foi observado o comportamento sexual e, quando em estro, eram acasaladas apenas uma vez em cada momento, até não aceitarem mais a monta.

4.6 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA (US)

Em ambos os Experimentos, a US iniciou três dias antes da aplicação dos protocolos hormonais para identificação da fase do ciclo estral que cada indivíduo se encontrava (Figura 1 e 2). No Experimento 1, nos três primeiros dias após a inserção do implante, a US foi realizada a cada 12 h. Posteriormente, os exames US foram conduzidos a cada 24 h, permanecendo nesta frequência até o último dia, objetivando a identificação do momento do surgimento de nova onda folicular (Figura 1). No Experimento 2, a US foi realizada a cada 24 h para avaliação da dinâmica folicular até 12 h antes da coleta de embriões (Figura 2).

Foi utilizado um aparelho portátil da marca SonoScape (SonoScape®, Modelo S 6, Shenzhen, China), com transdutor transretal multifrequencial de 5,0/7,5/10,0 MHz, adaptado para uso em pequenos ruminantes. Esta adaptação consiste na fixação de uma haste rígida ao cabo do transdutor, o que permite a movimentação do mesmo no interior do reto. As ovelhas foram colocadas em estação e contidas em um tronco próprio para pequenos ruminantes.

As fezes eram retiradas manualmente da ampola retal e com o auxílio de uma seringa de 60 mL, uma pequena quantidade de gel era depositada no reto do animal para lubrificar e aumentar a superfície de contato. Após a introdução do transdutor e inicial visualização da bexiga, o útero e os ovários foram avaliados e, posteriormente, os folículos foram mensurados. Para melhor compreensão da dinâmica folicular, o número, a posição relativa e o tamanho dos folículos ovarianos maiores ou iguais a 3 mm foram devidamente anotados em fichas individuais. Os folículos foram classificados de acordo com o seu tamanho em três classes; folículos menores ou iguais a 3,0 mm (folículos emergentes – início de uma nova onda folicular), folículos de 3 a 5,0 mm (folículos medianos – folículos em seleção), folículos acima de 5,0 mm (folículos dominantes).

A ovulação foi considerada quando o folículo pré-ovulatório que tinha sido identificado e acompanhado por vários dias, não foi mais identificado. O momento da ovulação foi definido como ocorrido na metade do intervalo entre a última visualização do folículo pré-ovulatório e o exame em que este não foi mais visualizado. O diâmetro ovulatório foi tomado da última mensuração do folículo que ovulou. O surgimento da onda folicular foi identificado como um grupo de folículos que cresceram a partir de 2 mm, sendo que um ou mais atingiram o diâmetro mínimo de 5 mm. O dia da emergência foi considerado quando o maior folículo, ainda com 2 ou 3 mm, foi identificado pela primeira vez retrospectivamente, próximo ao momento da ovulação.

4.7 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CORPOS LÚTEOS E COLETA DOS EMBRIÕES

No Experimento 2, foi realizado um exame por laparoscopia para a avaliação do número de corpos lúteos (CLs) nos ovários dos animais submetidos à superovulação seis dias após o início dos acasalamentos. Foram realizadas tricotomia e antissepsia no local das incisões. Foi utilizado Clorexidina Degermante (Riohex® Degermante 2%, Rioquímica, São Paulo, Brasil) e, em seguida, Clorexidina Alcoólica (Riohex® Alcoólico 0,5%, Rioquímica, São Paulo, Brasil).

Na laparoscopia, foram realizadas duas incisões pontuais na pele com lâmina de bisturi, paralelamente à linha alba, sendo uma em cada lado a aproximadamente 6 cm da linha média ventral e 3 cm a frente do úbere com objetivo de facilitar a introdução dos trocates: um trocater no lado esquerdo para a passagem da óptica de 5 mm e 30º (Óptica de laparoscopia, Karl Storz*®*, Alemanha) e visualização do aparelho reprodutivo e outro trocater no lado direito, destinado à passagem da pinça atraumática Bab Cok (33533BL Karl Storz*®*, Alemanha). Assim, os cornos uterinos eram tracionados, os ovários pinçados e realizada a contagem das estruturas: corpos lúteos vascularizados ou em regressão, cistos que eram separados por grupos (menor que 3 mm, de 3 a 5 mm e maior que 5 mm), e os cistos eram classificados em luteinizados ou foliculares (MORAES & SOUZA, 2002; EVANS, 2000; BARTLEWSKI, BABY & GIFFIN, 2011).

Após a contagem das estruturas, era realizada uma pequena incisão na linha alba e feito o pinçamento e exposição do útero, sendo realizada a lavagem do útero. Para esta lavagem, uma sonda de Foley número 8 (Embramac®, São Paulo, Brasil) era introduzida na porção proximal do corno uterino, próximo à junção útero-tubárica e o balão inflado para evitar refluxo de líquido. Na porção distal do corno uterino, colocava-se um cateter 18 G (BD®, New Jersey, EUA) por onde o meio DMPBS (Solução fosfatada tamponada modificada1 por Dulbecco), de Dulbecco & Vogt, modificado por Whittingham (1971), previamente aquecido a 37 ºC era injetado, permitindo a formação de um fluxo de líquido contínuo pelo corno até sua saída pela sonda de Foley. Foi utilizado um volume total de 40 mL de meio DMPBS por corno lavado. Durante a colheita, os cornos uterinos eram constantemente irrigados externamente com solução fisiológica acrescida de heparina sódica (Hepamax-S®, Blau Farmacêutica S.A, São Paulo, Brasil), a 37 ºC. O líquido recuperado de cada corno foi armazenado separadamente em placas de Petri (100 x 20 mm) para posterior avaliação das estruturas recuperadas.

O conteúdo uterino recuperado foi armazenado em placas de Petri e, em seguida, observado ao microscópio estereoscópico (Nikon, Japão) em um aumento de 20 X, a fim de se identificar as estruturas recuperadas. Os embriões foram posteriormente transferidos para o meio TQC Holding Plus (Nutricell®, São Paulo, Brasil), a 37 ºC e avaliados em relação estádio de desenvolvimento e qualidade (aumento de 50X). Os embriões foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS,1990). Quanto à qualidade, os embriões foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela IETS (1990), com adaptações.

4.8 SEDAÇÃO, ANESTESIA, CONTROLE DE DOR E MEDICAÇÃO PÓS-CIRÚRGICA

Os animais do experimento 2 foram submetidos a um jejum alimentar de 36 h e hídrico de 24 h. Foi utilizado como medicação pré-anestésica (MPA) a acepromazina na dose de 0,1 mg.kg-1 i.v. (Acepran®,Vetnil, São Paulo, Brasil), associada ao diazepam, dose de 0,5 mg.kg-1 i.v. (Diazepam, Teuto®, Goiás, Brasil) e a morfina na dose de 0,4 mg.kg-1 i.m. (Dolo Moff®, São Paulo, Brasil).

Após a realização da medicação pré-anestésica foi aplicado Propofol (Provine 1%,biopharma,São Paulo,Brasil) intravenoso para indução e assim os animais eram intubados através de um traqueotubo onde receberam anestesia inalatória à base de halotano e oxigênio. Os animais foram colocados em decúbito dorsal em macas apropriadas, com angulação aproximada de 450, sendo a cabeça mantida mais baixa em relação ao restante do corpo (posição de *Trendelenburg*). Posteriormente foi realizada anestesia local na região de inserção dos trocartes, utilizando lidocaína 2% (dose máxima de 7 mg.kg-1).

Logo após a laparoscopia e a laparotomia, os animais foram mantidos em ambiente tranquilo (baias coletivas), sem estresse, com água e alimentação *ad libitum*. Ao final destes procedimentos, os animais receberam durante três dias, a cada 24 h, anti-inflamatório não-esteroidal (Maxicam® 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mg.kg-1 via i.m. e antibiótico (Tetradur® LA-300, Merial, São Paulo, Brasil) na dose de 20 mg.kg-1 via i.m., a cada 48 h, totalizando três aplicações. Também foram realizados diariamente curativo (solução antisséptica de iodopovidona e *spray* com fenitrotion, cloridrato de clorexidina e alumínio). Todas as doadoras receberam duas doses de 0,0375 mg de cloprostenol intramuscular, aos sete e 15 dias após a colheita de embriões.

4.9 DOSAGEM DE PROGESTERONA

No Experimento 2, foram colhidas amostras para dosagem de progesterona (P4), diariamente, em todos os animais, desde a colocação do dispositivo até o momento da colheita de embriões. Para tanto, amostras de 4 mL de sangue total foram colhidas da veia jugular em tubos com EDTA. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 1000 g X 15 minutos e o plasma foi então aspirado e estocado a –20 ºC até a análise. O tempo entre a coleta e a estocagem não excedeu duas horas. As amostras foram analisadas no Laboratório de Dosagem Hormonal do Setor de Reprodução Animal, localizado na Faculdade de Veterinária da UFF em Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

A determinação das concentrações de P4 plasmática foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIA) utilizando kits comerciais (MP Biomedicals, LLC, Diagnostics Division, Orangeburg, NY, EUA) 10962MP Diagnosticals). A sensibilidade e coeficiente intraensaio foram 0,05 ng/mL e 9%, respectivamente. Todos os dados situaram-se dentro do ponto máximo e mínimo da curva.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de normalidade (Liliefors) dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo Teste de Kruskal Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. As paramétricas foram comparadas entre os grupos experimentais pela Análise de Variância (ANOVA), seguidas pelo Teste t de Student ou Tukey, dependendo da variável. O Teste de Bartlett foi utilizado para prever diferenças entre a homogeneidade das variâncias. Correlações de Pearson foram realizadas entre as variáveis. A diferença entre os dados foi aceita quando P < 0,05.

**5. RESULTADOS**

5.1 Experimento 1

No primeiro experimento, um total de 54,5% (36/66) dos animais estavam cíclicos e, consequentemente, 45,5% (30/66) não estavam ciclando. Das 66 ovelhas, um total de 10 animais não responderam ao protocolo de sincronização de onda, sendo uma ovelha do Gcontrole, seis do GBE, nenhuma do GGnRH e três do GBE+GnRH (Tabela 3). Destas 10 ovelhas, seis estavam cíclicas e quatro não cíclicas (P > 0,05).

Os resultados da dinâmica folicular acompanhados através da ultrassonografia, após as diferentes aplicações hormonais em cada grupo experimental, são apresentados na Tabela 3. Com relação ao tempo de emergência folicular, o GGnRH foi mais precoce (P < 0,05) comparado aos grupos que receberam estradiol (GBE e GBE+GnRH), mas não diferiu do grupo controle (P > 0,05). Similarmente, o GGnRH também foi mais precoce para atingir o tempo de dominância folicular comparado ao GBE (P < 0,05). Entretanto, não diferiu do Gcontrole e GBE+GnRH (P > 0,05). Foi obtida menor variância entre o tempo de emergência e dominância folicular no GGnRH, comparado ao GBE e GBE+GnRH (P < 0,05). A variância obtida no tempo de emergência folicular no Gcontrole também diferiu do GBE+GnRH (P < 0,05).

Tabela 3. Ciclicidade ao início do tratamento, resposta ao tratamento, status ovariano e momento da emergência e dominância da primeira onda folicular após a realização de quatro protocolos hormonais em ovelhas da raça Santa Inês (média ± EPM)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Momento** | Gcontrole | **GBE** | **GGnRH** | **GBE+GnRH** |
| **Ciclicidade (%)** | 53,3a (8/15) | 55,5a (10/18) | 50,0a (8/16) | 58,8a (10/17) |
| **Resposta ao tratamento (%)** | 93,3 (14/15) | 66,7 (12/18) | 100,0 (16/16) | 82,3 (14/17) |
| **Emergência (h)** | 56,6 ± 10,4b | 103,6 ± 22,0a | 52,5 ± 8,7b | 80,1 ± 21,4b |
| **Dominância (h)** | 91,7 ± 13,5b | 148,4 ± 25,7a | 86,3 ± 11,3b | 131,1 ± 25,5a,b |

a,b Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P < 0,05).

5.2 Experimento 2

No segundo experimento, um total de 90,9% (20/22) dos animais estavam cíclicos e, consequentemente, 9,1% (2/22) não estavam ciclando, sendo uma em cada grupo experimental.

Não foram encontradas diferenças na população folicular (folículos menores que 5 mm de diâmetro), entre os grupos, no dia da inserção do progestágeno/progesterona (7,8 ± 2,6 *vs.* 6,0 ± 1,6; P>0,05) e na primeira dose de FSH (8,2 ± 2,6 *vs.* 8,9 ± 2,3; P > 0,05). Quatro ovelhas apresentavam folículo dominante (FD; > 5 mm) no Gcontrole no Dia 0 (colocação da primeira fonte de progesterona para a sincronização da onda), enquanto no dia 9 (colocação da segunda fonte de progestágeno e da superovulação), apenas uma ovelha (8,3%) permanecia com FD. No momento da colheita de embriões, esta ovelha respondeu à superovulação, apresentando 6 CLs vascularizados. No Gteste, três ovelhas apresentavam FD no momento da colocação da progesterona, enquanto no início da superovulação, duas ovelhas (16,7%) mantinham FD. No momento da colheita de embriões, ambas responderam à superovulação, sendo uma com 6 CLs vascularizados e a outra 4 CLs, porém com sinais de RPCL.

Os dados de comportamento sexual e ovulação a partir da retirada da fonte de progestágeno/progesterona foram similares nos diferentes tratamentos e estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação dos intervalos (horas) da retirada do progestágeno/progesterona ao início do estro (IRE); duração do estro (DE); retirada do progestágeno/progesterona à primeira observação da ovulação (IRPO); fim da superovulação à primeira observação da ovulação (IFSOVPO) e início do estro à primeira observação da ovulação (IIEPO), em protocolos de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês (média ± EPM)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Gcontrole** | | | **Gteste** | | |
|  | **Média** | **Mín.** | **Máx.** | **Média** | **Mín.** | **Máx.** |
| **IRE** | 31,2 ± 2,7 | 24,0 | 36,0 | 25,2 ± 1,2 | 24,0 | 48,0 |
| **DE** | 40,8 ± 6,0 | 48,0 | 60,0 | 54,0 ± 2,0 | 12,0 | 72,0 |
| **IRPO** | 47,0 ± 3,4 | 30,0 | 54,0 | 40,8 ± 2,2 | 36,0 | 72,0 |
| **IFSOVPO** | 47,0 ± 3,1 | 36,0 | 72,0 | 34,8 ± 2,2 | 24,0 | 48,0 |
| **IIEPO** | 13,2 ± 2,2 | 6,0 | 30,0 | 15,6 ± 2,4 | 0,0 | 24,0 |

(P > 0,05)

Duas fêmeas do Gteste e três do GControle não foram coletadas, em função da baixa resposta. O número de CL contados no momento da laparoscopia (dia da coleta) não diferiu entre tratamentos (Tabela 5). O número de estruturas coletadas e embriões viáveis foram superiores no GControle comparado ao Gteste. A taxa de recuperação também diferiu entre os grupos experimentais sendo superior no GControle (75,6% *vs.* 8,1%; P<0,01).

A observação da coloração/aspecto dos CLs nos ovários no momento da laparoscopia, indicou que uma ovelha (Gcontrole) e seis ovelhas (Gteste) apresentavam RPCL. Após a análise da progesterona (Figura 3), confirmou-se maior frequência de RPCL no Gteste (5/10), quando comparado ao GControle (1/12), demonstrando que uma ovelha apresentava concentrações de progesterona compatíveis com CL funcional, apesar de o aspecto morfológico estar atípico.

No Gcontrole, um total de cinco (41,6%) ovelhas apresentaram cistos foliculares no momento da colheita, variando de um a três cistos em cada fêmea. No Gteste, foram seis (60,0%) ovelhas apresentando cistos foliculares, variando de um a dois cistos por animal.



Figura 3. Concentração plasmática de progesterona (P4) nos dias experimentais (D-5 à D5) no Gcontrole (n=12; A-M) e no Gteste (n=10; A-J) em ovelhas da raça Santa Inês.

Tabela 5. Recuperação embrionária e avaliação das estruturas recuperadas a partir de ovelhas da raça Santa Inês superovuladas utilizando dois tratamentos superovulatórios distintos (média ± EPM)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Gcontrole (n=12)** | | | **Gteste (n=10)** | | | |
|  | **Média** | **Mín.** | **Máx.** | **Média** | **Mín.** | **Máx.** |
| Ovelhas que responderam ao tratamento superovulatório (%) | 66 (8/12) | --- | --- | 80 (8/10) | --- | --- |
| Nº de CL contados\* | 6,9 ± 5,1a | 1 | 16 | 7,1 ± 1,0a | 2 | 14 |
| Total de estruturas coletadas | 4,8 ± 1,4a | 0 | 16 | 0,8 ± 0,3b | 0 | 2 |
| Nº de estruturas viáveis | 3,5 ± 1,1a | 0 | 10 | 0,3 ± 0,2b | 0 | 1 |
| Nº de estruturas degeneradas | 0,8 ± 0,5 | 0 | 6 | 0,1 ± 0,1 | 0 | 1 |
| Nº de estruturas não fecundadas | 0,2 ± 0,2 | 0 | 2 | 0,3 ± 0,2 | 0 | 1 |
| Taxa de recuperação embrionária | 75,6%a | 0% | 100% | 9,7%b | 0% | 28,6% |
| Taxa de viabilidade | 72,4%a | 62,5% | 100,0% | 33,3%b | 0% | 100,0% |
| Taxa de não fecundidade | 3,4% | 0% | 50,0% | 33,3% | 0% | 100% |
| Taxa de degeneração | 17,2% | 0% | 50,0% | 16,7% | 0% | 50% |
| Taxa de regressão precoce do CL | 8,3%a (1/12) | --- | --- | 60,0%b (6/10) | --- | --- |

\* Número de CLs contados na laparoscopia, considerando todas fêmeas, ou seja, que responderam ou não ao tratamento; valores entre parênteses referem-se ao n; a,b Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

**6. DISCUSSÃO**

A multiplicação de animais geneticamente superiores é realizada, sobretudo, com o auxílio de tecnologias de reprodução assistida. A produção de embriões *in vivo* é uma importante ferramenta para aumentar a contribuição de fêmeas geneticamente melhoradas para o conjunto de genes da população, principalmente se ela for realizada por meio da múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE). Essa, além de aumentar o número de descendentes de fêmeas geneticamente superiores, pode acelerar testes de progênie, permitir o intercâmbio de germoplasma para outras regiões ou países com o mínimo risco de transmissão de doenças, reduzir os custos e eliminar o estresse causado pelo transporte de animais (COGNIÉ, 1999; COGNIÉ et al., 2003, GONZALEZ-BULNES et al., 2004; MENCHACA et al., 2010). No entanto, a aceitação dessa tecnologia em ovinos tem sido lenta, principalmente devido à variabilidade da resposta ovariana ao tratamento superovulatório (COGNIÉ , 1999; GONZALEZ-BULNES et al., 2004).

A grande variação na resposta ovariana de ovelhas submetidas a programas de superovulação é um fator limitante da implantação comercial da MOTE nessa espécie. Apesar dos conhecimentos obtidos nos últimos tempos sobre a dinâmica folicular na ovelha e do avanço na produção de hormônios com qualidade e pureza, a busca por um protocolo capaz de fornecer uniformidade na resposta superovulatória e na produção de embriões viáveis, tem sido motivo de investigações por inúmeros grupos de pesquisadores, uma vez que corresponde a um dos passos mais críticos do processo (AMIRIDIS e CSEH, 2012). A presença de FD é um dos responsáveis pela variação na SOV, já que o FSH é o principal hormônio envolvido no crescimento folicular e sua concentração é controlada pela inibina e pelo estradiol produzidos pelo FD. Desta forma, para uma SOV eficiente, são utilizadas grandes doses de FSH com o objetivo aumentar o número de folículos ovulatórios, ovulações e embriões, em um momento preferencialmente que não haja a presença de FD.

Para evitar a presença do FD no momento de início da SOV, algumas estratégias foram propostas e são encontradas na literatura em ovinos. Dentre elas, uma ferramenta que vem sendo bastante utilizada em bovinos e, mais recentemente em ovinos, é a sincronização da onda folicular. Apesar disso, são poucos os estudos comparando protocolos para atingir esta sincronização de forma mais eficiente em ovinos.

O Experimento 1 do presente estudo comparou quatro tratamentos distintos de sincronização do ciclo estral, com o objetivo de identificar qual seria mais eficiente em sincronizar uma nova onda folicular. Os hormônios foram administrados no dia zero do protocolo. Estratégias utilizando GnRH e BE já foram extensamente testadas em bovinos e apresentaram resultados satisfatórios. A administração de estrogênio exógeno exerce uma função no controle fisiológico das fêmeas, induzindo o pico pré-ovulatório de LH e consequentemente ovulação (PURSLEY et al., 1997), além de poder exercer atividade luteolítica durante a fase luteal (SALFEN et al., 1999). Estes efeitos justificam a inclusão de estradiol nos protocolos de sincronização, favorecendo a ação da prostaglandina quando associada ao estradiol, o que aumenta a precisão da sincronização (SCHMITT et al., 1996).

Os resultados da dinâmica folicular foram obtidos por acompanhamento ultrassonográfico em diferentes momentos. Com relação ao tempo de emergência folicular, o GGnRH foi mais precoce comparado aos grupos que receberam estradiol, mas não diferiu (P>0,05) do grupo controle. Similarmente, o GGnRH também foi mais precoce para atingir o tempo de dominância folicular comparado ao GBE; entretanto, não diferiu dos demais. Foi obtida menor variação entre o tempo de emergência e dominância folicular no GGnRH, comparado ao GBE e GBE+GnRH. Além disso, maior número de animais não respondeu, ou seja, não apresentaram uma onda folicular completa, nos grupos recebendo E2 durante o período de estudo. Isto pode ser explicado pela ação inibitória do E2 sobre o FSH e estímulo de uma nova onda folicular, diferentemente do observado por Meikle et al. (2001) e Barrett et al. (2008). Devido ao fato de não haver diferença entre GGnRH e Gcontrole no Experimento 1, foi utilizado apenas P4 e prostaglandina (Gcontrole) para a sincronização da onda folicular e posterior superovulação no grupo teste do experimento 2.

No Experimento 2, não foram encontradas diferenças na população folicular – folículos menores que 5 mm de diâmetro, entre os grupos, no dia da inserção do progestágeno/progesterona (7,8 ± 2,6 *vs.* 6,0 ± 1,6) e na primeira dose de FSH (8,2 ± 2,6 *vs.* 8,9 ± 2,3). Embora não tenham sido encontradas diferenças neste parâmetro, o estágio do ciclo estral em que esses animais se encontravam também é importante. Ressalta-se que tal fato estava ajustado no protocolo do Gcontrole, onde os animais haviam sido induzidos à ovulação anteriormente e, portanto, estavam todos na primeira onda folicular no momento do início da superovulação. Por outro lado, por motivo inerente ao protocolo, no Gteste, os animais poderiam estar em qualquer onda folicular no momento do início da superovulação, entretanto demostra que o tratamento utilizado, somente o uso do prosgestágen foi suficiente para sincronizar a onda de crescimento folicular e assim permitir o mesmo status ovariano quando comparado com o Gteste.

No Gcontrole, no Dia 0 e no Dia 9 (SOV), respectivamente, quatro e uma ovelha(s) apresentava(m) FD. Esta ovelha última respondeu à SOV e foi coletada. No Gteste, no Dia 0 e no dia da SOV, respectivamente, três e duas ovelhas apresentavam FD. Ambas responderam à SOV, sendo uma com 6 CLs vascularizados e a outra 4 CLs, porém com sinais de RPCL. A presença do FD fisiologicamente ativos no início da SOV pode ter contribuído para a ocorrência da RPCL, conforme descrito por Okada et al. (2000). Entretanto, outras ovelhas também apresentaram este fenômeno e não apresentaram RPCL, possivelmente nestas os FD já estavam em regressão e não influenciaram.

Na laparoscopia, uma ovelha (Gcontrole) e seis ovelhas (Gteste) apresentavam RPCL e após a análise da progesterona, confirmou-se maior frequência de RPCL no Gteste (5/10), quando comparado ao GControle (1/12). Curiosamente, estes dados indicam que uma ovelha apresentava concentrações de progesterona compatíveis com CL funcional, apesar de o aspecto morfológico estar atípico, ou seja, demonstra que animais com RPCL devem ser coletados.

A RPCL é um importante entrave na MOTE de pequenos ruminantes. Apesar de existirem maior número de relatos na espécie caprina, sabe-se que as ovelhas também são susceptíveis à RPCL, possivelmente na mesma magnitude. Este evento pode ocorrer em até 75% das ovelhas, principalmente quando superovuladas. Este fenômeno pode resultar em fator tóxico ao embrião, gerando, como principal consequência, baixa taxa de recuperação de embriões viáveis, já que a recuperação de embriões ocorre entre os dias 6-7 após os acasalamentos. A reduzida taxa de recuperação provavelmente ocorre porque os embriões são submetidos a condições uterinas sob concentrações reduzidas de P4, causando prejuízos consideráveis à sua qualidade antes mesmo da colheita (revisado por RODRIGUEZ et al., 2015). Desta forma, apesar das taxas similares (66 *vs* 80%) de resposta aos protocolos, o número de estruturas coletadas e embriões viáveis foram superiores no GControle comparado ao Gteste. Consequentemente, a taxa de recuperação também diferiu entre os grupos experimentais sendo superior no GControle (75,6% *vs.* 9,7%). Uma das etiologias propostas para a RPCL, é a ocorrência de folículos persistentes, que não são capazes de ovular, e continuam a produção de estrógenos, levando à liberação precoce de PGF2α (Okada et al., 2000). Das seis fêmeas apresentando RPCL no presente estudo, foram encontrados folículos persistentes em três ovelhas.

Com relação ao status cíclico dos animais ao início do experimento, no primeiro, em torno de 55% das ovelhas estavam cíclicas ao iniciar o tratamento hormonal. Ao considerar que os animais estavam no período de inverno e primavera, pode-se caracterizar que a raça não apresentou comportamento poliéstrico anual, conforme descrito por Da Costa, (2007) e corroborando relatos de Balaro et al. (2014) na mesma raça. Por outro lado, no segundo experimento, um total de 90,9% (20/22) dos animais estavam cíclicos. O número expressivo de animais cíclicos ocorreu devido à estação de monta, já que este ensaio foi realizado no outono. É importante o conhecimento do *status* cíclico dos animais no início de cada Experimento, já que está descrito que este fator poderia causar um viés nos resultados, o que não ocorreu no presente estudo.

**7. CONCLUSÕES**

No presente estudo, o uso de BE ou GnRH, sozinhos ou em associação não resultou em melhorias no momento do surgimento e na sincronia de nova onda de crescimento folicular em ovelhas. Enquanto a aplicação de BE apresentou resultados inferiores ao controle, o grupo recebendo GnRH não promoveu maiores benefícios em comparação ao controle. Na superovulação, não houve diferença entre o estado folicular ovariano e número de corpos lúteos entre os tratamentos. Entretanto, a maior taxa de RPCL no Gteste possivelmente contribuiu para o menor número de embriões viáveis obtidos. Assim, como base nos resultados obtidos, indica-se o GControle do segundo experimento para a produção de embriões em ovinos da raça Santa Inês manejados sob condições tropicais.

**8. BIBLIOGRAFIA**

ABECIA, J.A.; FORACADA, F.; ZARAZAGA, L. The incidence of luteal activity as determined by peripheral plasma progesterone concentration, before the onset of the breeding season in the Rasa Aragonesa breed of sheep. *Bras. Vet. J*., v.152, 1996

MALPAUX, B.; VIGUIÉ, C.; THIÉRY, J.C.; CHEMINEAU, P. (1996) Photoperiodic control of reproduction; *Productions Animales*, v. 9.

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, 2004.

ADAMS, G.P.Comparative pattems of follicle development and selection in ruminants. *Journal Reproduction Fertillity Supplement*, v. 54, 1999.

ALILA, H.W., HANSEL, W.; Origin of differents cells types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of reprodution*, v.31, 1994

ALMEIDA VM, CÂMARA DR, SALLES HO, OLIVEIRA DPF, MEDEIROS JN,ALVES OMM. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, supl 5, p.82-84, 2002.

AMIRIDIS GS, CSEH S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*, v.130, 2012.

ARMSTRONG DT, EVANS GM. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v.19, p.31-42, 1983.

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, Stoneham, v. 39, p. 31-42, 1983.

ARMSTRONG, D.T., PFITZNER, A.P., PORTER, K.J. et al. Ovarian response of anoestrus goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotrophin. *Anim. Reprod. Sci*., v.5, p.15-23, 1982.

BAIRD D.T. 1992. Luteotropic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci*.

BALDASSARE H, KARATZAS CN. 2004 Advancet assisted reproduction technologies (ART) in goats.*Anim Reprod Sci*, 82-83.

BALDASSARRE, H. Coleta, Conservação e Transferência de Embrião. In: AISEN, 2 E.G. *Reprodução ovina e caprina*. 1ª Ed. São Paulo-SP: MedVet, 143-152, 2008

BAO B. & GARVERICK H.A. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76:1903-1921

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

BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J.F.; SAUMANDE, J.. Synchronization of estrus in goats: the relationship *Congresso Brasileiro de* Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais: Palestras 7 between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology,* v.45, p.1553-1559, 1996.

BARRETO NETO, AD. Posicionamento estratégico do setor de carnes de caprinos e ovinos no mercado de carnes brasileiro. In: *Simpósio internacional sobre caprinos e ovinos de corte*, III, 2007, João Pessoa, Proceedings... João Pessoa: EMEPA, 2007.

-BARTLEWSKI P.M, BEARD A.P.,RAWLINGS N.C., Na ultrassonographic study of luteal function in breeds of sheep with diferent ovulation rates. *Theriogenology*, v.52, p. 115-130, 1999.

-BARTLEWSKI P.M., BABY T.E., GIFFIN J.L., Reproductive cycles in sheep *Animal reproduction Science*, v.124, 2011.

BARTLEWSKI PM, ALEXANDER BD, KING WA. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. *Small Rumin Res*, v.75, 2008.

-BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; RAELINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J. Reprod. Fertil*., v. 113, 998.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, v.35, 1991.

CAHILL L. P., Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.30, p. 135-142, 1981.

CAHILL LP, MAULEON P. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J Reprod Fertil*, v.30, 1980.

CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. (1995) Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fert., Suppl*., v.49.

CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. (1995) Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fert*., Suppl., v.49.

CAMPBELL, J.W.; HARVEY, T.G.; MCDONALD, M.F.; SPARKSMAN, R.I. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology, v. 45, 1996.*

CBRA. *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed, Belo Horizonte, 49 p, 2013.

CERVANTES MJ, JUARÉZ ML, MEJÍA VO, BERRUECOS VJM, VERA AH, VALENCIA J. Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim Reprod Sci*, v.97, p.47-54, 2007

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

COGNIÉ Y. 1999. State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51:105-116.

COOKE, R.G; HOMEIDA, A.M. Suppression of prostaglandin F-2 alpha release and delay of luteolysis after active immunization against oxytocin in the goat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1985.

CORTEEL, J.M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rumim Res*, v.1, 1988.

CUNNINGHAM, J.G. Tratado de fisiologia veterinária. 3.ed. *Guanabara Koogan*, 2004. 596 p.

CUPPS, P.T. Reproduction in domestic animals. 4.ed. San Diego : Academic, 1991. Cap.16, p.522-525.

DACOSTA, N.G. A cadeia produtiva de carne ovina no Brasil, rumo às novas formas de organização da produção. 2007.182p. *Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal do Tocantins, Brasília*, 2007.

DATTENA M., ACCARDO C., PILICHI S., ISACHENKO V., MARA L., CHESSA B., CAPPAI P., 2004.Comparasion of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*, 62, p. 481 493.

DATTENA M., PTAK G., LOI P., CAPPAI P.,2000. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53, p.1511-1519.

DAVIS, J.S.; RUEDA, B.R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. Frontiers in bioscience: *a journal and virtual library*, v.7, 2002.

DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R.; FRY, R.C. (1991) Does follicular dominance occur in ewe? *J. Reprod. Fert*..; 93:63-70.

DYRMUNDSSON, Ó.R. Studies on the breeding season of Icelandic ewes and ewes lambs. *Journal of Agricultural Science*, v.90, 1978.

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

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

-EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Salamon´s artificial insemination of sheep and goats. *Sydney: Butterworths*, 1987. 194 p.

EVANS, N.P., MCNEILLY, J.R., WEBB, R. 1994. Alterations in endogenous gonadotropin secretion and pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in adult ewes, following indirect selection in prepubertal male lambs. *Biology of Reproduction*. 51,913-919.

FAIRCLOUGH, R.J.; SMITH, J.F.; PETERSON, A.J. Passive immunization against oestradiol-17β and its effect on luteolysis, oestrus and ovulation in the ewe. J. *Reprod.. Fertil*., v.48, p.169-171, 1976.

FIELDS MJ, FIELDS PA. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, v.45, p.1295-1325, 1996.

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

FIGUEIREDO, E.A.P.de, SIMPLÍCIO, A.A., LIMA,F.A.M., et al. Mortalidade de caprinos em sistema tradicional de manejo na região nordeste. Sobral: EMBRAPA – CNPC.1980.4p.(EMBRAPA – CNPC. Comunicado técnico, 6).

FONSECA JF, BRUSCHI JH. 2005b. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Rev Ciências Agrárias*, 43:1-13.

FONSECA JF, SIMPLÍCIO AA. 2008. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. *In: I Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia* – AMAZONPEC, Belém, Pará,30 de outubro a 02 de novembro de 2008, p.1-21.

FONSECA JF, SIMPLÍCIO AA. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. In: Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia – AMAZONPEC, 1, 2008, Belém, PA. Anais ... 2008, Belém: FAEPA, Instituto Frutal, SEBRAE-PA, 2008. CD-ROM

FONSECA JF, SOUZA JMG, BRUSCHI JH. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Simpósio de Caprinos e Ovinos, 2, 2007, Belo Horizonte.* Anais... Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2007. Resumo.

Fonseca JF, Souza JMG, Bruschi JH. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos, 2, 2007, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2007. Resumo.

FONSECA JF. 2002. Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras Alpinas e Saanen. Viçosa, MG: *Universidade Federal de Viçosa, (PhD Thesis)*.

FONSECA JF. 2006A. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. Embrapa Caprinos, Documentos 64.

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

FONSECA, J.F. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. *Embrapa 14 Caprinos*, Documentos 64, 2006.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; RODRIGUES, M.T.; SANTOS, A.D.F.; FÜRST, R.; PROSPERI, C.P.; MAFFILI, V.V.; ROVAY, H. Estrus, ovulation time and progesterone in Alpine and Saanen nulliparous goats synchronized with prostaglandin. *Acta Sci. Vet*., v.31, 2003.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M.; (2001); Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle; Biology of Reproduction; vol. 65; pp. 648-654

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, v.50, 1994.

FOXCROFT, G.R.; HUNTER, M.G. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 33, p. 1-19, 1985.

FREITAS, V.J.F.; LOPES JÚNIOR, E.S. Controle do estro e da ovulação em caprinos. In: GONSALVES, P. B. D. et al. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Varela, 2002. p. 57-68.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Transferência de embriões em caprinos. In: Gonçalves 59 P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São 60 Paulo: Livraria Varela, 2002. 179-194.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Transferência de embriões em caprinos. In: Gonçalves 59 P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São 60 Paulo: Livraria Varela, 2002. 179-194.

GARCIA-GARCIA, R.M.; DOMINGUEZ, V.; GONZALEZBULNES, A. et al. Effect of embryo developmental stage and culture conditions on number and quality of ovine in vitro produced blastocysts. Zygote, v.14, p.181-187, 2006.

GIRÃO, R.M.; MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, E.S. Índices produtivos de ovinos da raça Santa Inês no Estado do Piauí. Teresina: Embrapa-UEPAE Teresina, 1984. 6p. (Embrapa.UEPAE Teresina. Pesquisa em Andamento, 34).

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; FIGUEREDO, José Ricardo de; FREIT, Vicente José de Figueredo. *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal. 2*. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GONZALES CIM, OLIVEIRA VS. Técnicas para incrementar a eficiência reprodutiva de caprinos e ovinos. *Rev Soc Bras Zootec*, v.28, p.71-102, 1991.

GONZALES-BULNES A, BAIRD DT, CAMPBELL BK, COCERO MJ, GARCIA-GARCIA RM, INSKEEP EK, LOPEZSEBASTIAN A, MCNEILLY AS, SANTIAGO-MORENO J, SOUZA CJ, VEIGA-LOPEZ A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.421-435, 2004.

GONZALES-BULNES A, BAIRD DT, CAMPBELL BK, COCERO MJ, GARCIA-GARCIA RM, INSKEEP EK, LOPEZSEBASTIAN A, MCNEILLY AS, SANTIAGO-MORENO J, SOUZA CJ, VEIGA-LOPEZ A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev,* v.16, p.421-435, 2004.

GONZALES-BULNES A, SANTIAGO-MORENO J, GOMEZ-BRUNET A, LOPEZ-SEBASTIAN A. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod Domest Anim*, v.35, p.65-68, 2000.

GONZALEZ-BULNES A, GARCIA-GARCIA RM, CASTELLANOS V, SANTIAGO-MORENO J, DOMÍNGUEZ V, LOPEZ-SEBASTIAN A, TREGUERRES JAF, COCERO MJ. 2003. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev*, 43:1728.

GONZALEZ-BULNES A, GARCIA-GARCIA RM, SANTIAGO-MORENO J, LOPEZ-SEBASTIAN A, COCERO MJ. Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by the presence of corpus luteum at the first FSH dosage. *Theriogenology*, v.58, p.1607-1614, 2002.

GORDON, I. Controlled reproduction in sheep and goats. Cambridge, UK: University Press, 1997.

HAFEZ, E.S.E, *Reprodução animal 4 ed*., São Paulo, Manole, 1982, 720p.

HAFEZ, E.S.E. (1952) Studies of the breeding season and reproduction of the ewe; *J. Agric. Sci.*; 42(3):189-231.

HALBERT, G.W.; DOBSON, H.; WALTON, J.S. The structure of cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, v.33, p.977-992, 1990.

-HARE, L.; BRYANT, M.J. Characteristics of oestrous cycles and plasma progesterone profiles of young female sheep during their first breeding season. *Animal Production*, v.35,1982.

HERRERA, H. L.; FELDMAN, S. D.; ZARCO, Q. L. Evaluacion del efecto luteolítico de la prostaglandina F2α em diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Veterinaria México,* v. 21, p. 143-147, 1990.

HOMANICE, G.E.; SILVIA, W.J. Role of phospholipase C in mediating oxytocin – induced release of prostaglandina F2 alpha from ovine endometrial tissue. Prostaglandins, v.35, 1988.

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default_xls_perfil.shtm>

HUNTER, M.G. et al. Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH iduced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal copora lutea in anestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.76, p.349-363, 1986.

KARSH, J.J. (1984) Endocrine and environmental control of oestrous cyclicity in sheep; *Reproduction in Sheep*, v.1, p.10-15.

Ko Y, Young Lee C, Ott TL, Davis MA, Simmen RCM, Bazer FW, Simmen FA. Insulin-like growth factor in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-1 production during early pregnancy. *Biol Reprod*, v.45, p.135-142, 1991

KULICK, L. J. et al. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v. 52, p. 913-921, 1999.

KUSINA, N.T.; TARWIREI, H.; HAMUDIKUWANDA, H. et al. A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF2α and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goats does. *Theriogenology,* v.53, p.1567-1580, 2000

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

LEYVA, A.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewe by exogenous progestagen. *Theriogenology*, v. 50, n. 3, p. 395-416, 1998.

LINDNER GM, WRIGHT RW. Ovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v.20, p.407-416, 1983.

LUCY, M. C. H. J.; BILLINGS, W. R.; BUTLER, L. R.; EHNIS, M. J.; FIELDS, D. J.; KESLER, J. E.; KINDER, R. C.; MATTOS, R. E.; SHORT, W. W.; THATCHER, R. P.; WETTEMANN, J.V.; YELICH AND H. D. HAFS. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2a for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal heifers and dairy heifers. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 982-995, 2001.

-LUCY, M.C.; BECK, J.; STAPLES, C.R. et al. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor(IGF-1) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. *Reprod. Nutr. Dev*., v.32, p.331-341, 1992

MARTINEZ, A.G.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A., 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Rum. Res*., 63, 288-296.

MAYORGA I, MARA L, SANNA D, STELLETTA C, MORGANTE M, CASU S, DATTENA M. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology*, v.75, p.16611668, 2011.

McCRAKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C.; Luteolysis: a neuroendocrine mediated enent. *Physiplogical Revewes*, v.79(2), 1999.

MCGINNIS LK, DUPLANTIS SC, YOUNGS CR. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Anim Reprod Sci*, v.30, p.273-280, 1993.

MEDAN, M.S., WATANABE, G., SASAKI, K., SHARAWY, S.,GROME, N.P., TAYA, K.; Folicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. *Journal of reprodution. And development*., v.51, n.4, 2005.

MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; GARÓFALO, E.G. et al. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrous ewes after treatment with estradiol 17-b . *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.79-90, 2001.

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

MENCHACA A, VILARIÑO M, CRISPO M, DE CASTRO T, RUBIANES E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.113-118, 2010.

MENCHACA, A.; MILLER, V.; GIL, J.; LACA, M.; RUBIANES, E. Prostaglandin F2α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reproduction Domestic Animal*, v. 39, p. 352-355, 2004.

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. follicular recruitment ond ovulatory.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New 7 approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod. Fert. 8 Dev*., v.22, 2010.

MIES FILHO, A.; SELAIVE, A.; HOOGESTRATEN, M.I.M.J.; MATTOS, S. de.; WALD, V.B. Variacao estacional da morfologia espermatica de ovinos da raca corriedale. *Arquivo da Faculdade de Veterinaria da UFRGS*, v.7, p.121-134, 1979.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H. de; GONÇALVES, P.B.D. (2002) Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos; IN: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R. de; FREITAS, V.J.F.; *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*; ed. Varela.

NISWENDER G.D., JUENGEL J.L., MCGUIRE W.J., BELFIORE C.J. & WILTBANK M.C. 1994. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. Biol. Reprod.

NISWENDER, G.D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev*, v.80, n.1, 2000.

NISWENDER, G.D. et al. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. *Recent Prog Horm Res*, v.41, 1985.

NOGUEIRA, D. M.; MISTURA, C.; VOLTOLINI, T. V.; TURCO, S. H. N.; ARAÚjO, G. G. L. de; LOPES, A. M. G.; SOUzA, T. C. de. Avaliação clínica, parasitológica de fezes e produtiva de cordeiros em pastagens de capim-aruana irrigado e adubado com diferentes doses de nitrogênio. In.: *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE zOOTECNIA (SBz)*, 45., 2008, Lavras, MG. Anais... Lavras, MG: UFLA, 2008. CD ROM. Disponível em : <http:// [www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CPATSA/38484](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CPATSA/38484)

NUNES, J. F.; FIGUEIRÓ, P. R. P. Fatores que afetam o comportamento reprodutivo em ovelhas Corriedale e Polwarth*. Revista do Centro de Ciências Rurais*, Santa Maria, v.5, n.4, 1975.

OKADA A, KAMADA S, JEON CW, MIYAMOTO A, FUKUI Y. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Development,* v.46, p.397-402, 2000.

OKADA, A.; KAMADA, S.; JEON, C-W.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y.. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *J. Reprod. Dev*., v.70, p.281-282, 2000.

OLIVEIRA MEF, FELICIANO MAR. Ultrassonografia da Reprodução. In: Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos. *Primeira edição. São Paulo: MedVet*, p.121-146, 2013b

OLIVEIRA, M.E.F. Estado da arte da superovulação em ovinos. In: Anais da *XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)*, p.65-70, 2011.

OLIVEIRA, MEF. Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e superovulação em ovelhas santa inês. *Tese de doutorado, unesp Jaboticabal*, 2011b.

OLIVEIRA, V.S.; GONZALES, C.I.M. Transferência de embriões em caprinos. I *Simpósio nordestino sobre caprinos e ovinos deslanados*. 21-32p, 1992

PATE, J.L. 1996. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology.*

PATE, J.L., TOWNSON, D.H. Novel local regulators in luteal regression. *J. Anim. Sci*., 72 (sppl.3): 31-42, 1994.

PEIXOTO MGCD, VERNEQUE RS, TEODORO RL. 2006. Genetic trend for milk yield in Guzera herds participating in progeny testing and MOET nucleus schemes. Gen Mol Res, 5:454-465.

PENNA VM, MADALENA FE, ALVIM MTT. 1998. Open MOET nucleus of selection in Guzerá. In: WCGALP, 6, Australia, 1998. Proceedings... Armidale : WCGALP.

POTES, J.A.C. Transferência embrionária em caprinos. Vila Real. *Universidade de trás-os-Montes e Alto Douro,1990,54 p. Tese de Doutorado*.

-PRUCOLI, J.O., BACCARI Jr., F. Estudos sobre estação de monta em ovinos no Estado de São Paulo. *Boletim da Indústria Animal, São Paulo*, SP., n. 24, p. 75-79, 1967.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C.; Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α AND gnrh. T*herigonology*, New York, v. 44, p. 915-923, 1995.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; 10 ANDRADE, J.C.O. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos.

GONÇALVES, P.A.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p. 127-177, 2002.

RIBEIRO, E. L. A.; ROCHA, M. A.; SILVA, L. D. F. Aspectos reprodutivos em ovelhas Hampshire Down submetidas a monta contínua na região norte do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira Zootecnia*, Viçosa, v.25, n.4, p.637646, 1996.

RODA, D.S., SANTOS, L.E., CUNHA, E.A., et al.. Desempenho de ovinos Ideal e Corriedale em sistema de acasalamento a cada oito meses. *Boletim da Indústria Animal*, Nova Odessa, SP, v. 50, n. 12, p. 49-54, jan./jun., 1993.

RODRIGUES, P.A., Avaliação da sazionalidade reprodutiva e perfil secretório de melatonina em ovelhas Santa Inês das raças Romney Marsh, Sulffolk e Santa Inês. 2001. 82 p. *tese(doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.*

RODRIGUEZ, M. G. K., AMBROGI, M., VRISMAN, D. P., MACIEL, G. S., FELICIANO, M. A. R., TEIXEIRA, P. P. M. Aspiração folicular por laparoscopia em ovinos. *Revista investigação medicina veterinária*. v.14, p.55-60, 2015.

ROSA HJD, BRYANT MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res*, v.48, p.155-171, 2003.

RUBIANES, E. (2000) Avances en el conocimiento de la fisiologia ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo; *Actas de Fisiologia*; 6: 93-103.

RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S. Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, v. 49, p. 356-362, 1998.

RUBIANES, E.; de CASTRO, T., CARBAJAL, B. (1996) Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitores ewes; *Can. J. Anim. Sci*.; 76: 473-475.

SÁ FILHO OG, VASCONCELOS JLM. Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. *Rev Vet e Zootec*, v.15, p.220-233, 2008.

SAHARREA A, VALENCIA J, BALCÁZAR A, MEDJA O, CERBÓN JL, CABALLERO V, ZARCO L. 1998. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, 50:1039-1052.

SALFEN, B. E.; CRESSWELL, J. R.; XU, Z. Z.; BAO, B.; GAVERICK, H. A.; Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovinoestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*., Cambridge, England, v. 115, p. 15-21, 1999.

SANGHA GK, SHARMA RK, GURAYA SS. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Rumint Res,* v.43, p.53-64, 2002.

SANTANA, A. F de. Transferência de embriões em caprinos. *Seminário apresentado no curso de mestrado em produção e reprodução de pequenos ruminantes da faculdade de veterinária da Universidade Estadual do Ceará.* Fortaleza-Ceará, 1994.

SANTOS GMC, SILVA KCF, CASIMIRO TR, COSTA MC, MORI RM, MIZUBUTI IY, MOREIRA FB, SENEDA MM. Reproductive performance of ewes mated in the spring when given nutritional supplements to enhance energy levels. *Anim Reprod*, v.6, p.422-427, 2009.

SASA, A.; RODRIGUES, P.A; TESTON, D.C.; COELHO, L.A.; CRIVELLENTI, T.L.; DA SILVA, E.C.F (2001) Incidência sazonal de estros em borregas lanadas e deslanadas criadas no estado de São Paulo. In: 38º *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Piracicaba, p.383-384.

SASA, A.; TESTON, D.C.; CRIVELLENTI, T.L; RODRIGUES, P.A; DA SILVA, E.C.F; COELHO, L.A. (2002) Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas durante o período de abril a novembro no estado de São Paulo. *Rev. Bras. Zootec*., v.31.

SCHIEWE MC, FITZ TA, BROWN JL. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F2-a receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J Reprod Fertil*, v.93, p.19-30, 1991.

SCHMITT, E. J. P.; DIAZ, T.; DROST, M.; THATCHER, W. W.; Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science., Savoy, Illinois*, v. 74, p. 10841091, 1996.

SELAIVE, A.; MIES FILHO, A. Transferência de óvulos fecundados em ovinos.

-Shelton M. *Reproduction and breeding of goats.J Dairy Sci*, 1978 Jul;61(7):994-1010.

SHIRASUNA, K.;NITTA, A.;SINEENARD, J.;SHIMIZU, T.;BOLLWEIN, H. &MIYAMOTO, A. 2012. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic Animal Endocrinology.*

SILVA JC, QUINTELA A, ANDRADE MOURA JC, RESENDE J, GORDIANO HD, MARTINS LEP, CHALHOUB M, RIBEIRO FILHO AL, GUSMÃO AL. Avaliação da colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês. *Acta Sci Vet*, v.32, p.90, 2004. Resumo.

SILVA, O. L.; FIGUEIRÓ, P. R. P. Efeito da época de cobertura sobre a fertilidade de ovelhas e mortalidade de cordeiros na raça Corriedale. In: *reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia*, 27., 1980, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1980

.

SIMÕES J, CUNHA T, AZEVEDO J, PEREIRA F, MASCARENHAS R (2007). Sincronização do estro e taxa de gestação após efeito macho associado a um tratamento progestagénico curto em cabras. Jornadas de Reprodução - *IV Jornadas da AEMVUE / VI Simpósio da SPRA.* Évora, 16–18 de Março. Livro de Resumos.

SIMONETTI L, FORCADA F, RIVERA OE, CAROU N, ALBERIO RH, ABECIA JA, PALACIN I. Simplified superovulatory treatments in corriedale ewes. Anim *Reprod Sci*, v.104, 2008.

SIMPLÍCIO, A.A.; RIERA, S.; NUNES, J.F.; FOOTE, W.C. Idade, peso e atividade ovariana a puberdade em borregas das raças Morada Nova, Santa Inês e Somalis. In: *simpósio nacional de reprodução animal*, 4., 1981, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1981b. p.43.

SIMPLICIO, AA Caprinocultura e ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária – Brasília – DF. n.52, 2011. p.27-35.

SOUSA, W. H. de. Genetic and environmental factors affecting growth and reproductive performance of Santa Ines sheep en the seme-arid region of Brazil. Texas: Texas A&M University, 1987. 79p. *(Mestrado em Zootecnia) -Texas A&M University.*

SOUZA CJH, CAMPBELL BK, BAIRD DT. Efeito do gene Booroola (FecB) na dinâmica folicular e secreção hormonal em ovelhas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.192-195, 1997.

TEODORO RL, VERNEQUE RS, MARTINEZ ML. 2006. Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite: *resultados do Teste de Progênie, do Arquivo Nacional e do Núcleo Moet.* Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2006. 24p.

VAJTA G, KUWAYAMA M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v.65, p.236-244, 2006.

VALLET, J. c.; BRELURUT, A.; BARIL, G.; THERIEZ, M. & CHUPIN, D. Embryo production and transfer in red deer (Cervus elaphus). *In: Reunion Assoc. Europ. The Transfert Embryonnaire*, 6, 1990, Lyon. Procceding, Lyon, 1990.

VARAGO FC. Superovulação em ovelhas da raça Santa Inês e criopreservação de embriões. 2009. 80f. *Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária*, Belo Horizonte, MG, 2009.

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

VEIGA-LOPEZ, A.; DOMINGUEZ, V.; SOUZA, C.J.H.; GARCIA-GARCIA, R.M.; ARIZNAVARRETA, CARMEN.; TRESGUERRES, J.A.F.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Features of follicle-stimulating hormone stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles, Fertility and Sterility. v. 89, p. 1328-1337, 2008.

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

VIU, M.A.O.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; LOPES, D.T. et al. Fisiologia e manejo reprodutivo de ovinos: *revisão. Rev. Eletr. Fac. Montes Belos*, v.1, p.79-98, 2006.

VOSS A.K. & FORTUNE J.E. 1993. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17a-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*.

WARWICK, B.L., BERRY, R.O., HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. Proc. Amer. *Sci. Anim. Produc*. p.225, 1934.

WARWICK, B.L.; BERRY, R.O.; HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. *Proceedings American Society Animal Production*, Annual Meeting, v.27, 1934.

WEBB R., GARNSWORTHY P. C., GONG J. G. & ARMSTRONG D. G. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82:63-74.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement*, Cambridge, v. 61, p. 71-90, 2003.

WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v.233, p.125, 1971.

WILDEUS, S., 1999. Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci*. (39) 1–14.

WOOD, J.D. et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, v.66, n.1, p.21-32, 2004.

**9. ANEXOS**

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense, n° 452/2013.

