

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

PEDRO HENRIQUE NICOLAU PINTO

MÉTODOS DE SELEÇÃO DE DOADORAS, AVALIAÇÃO E REPETIBILIDADE
DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Niterói, RJ

2018

PEDRO HENRIQUE NICOLAU PINTO

MÉTODOS DE SELEÇÃO DE DOADORAS, AVALIAÇÃO E REPETIBILIDADE
DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

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

Orientador:

PROF. DR. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO

Coorientadores:

DR. JEFERSON FERREIRA DA FONSECA

DR. MÁRIO FELIPE ALVAREZ BALARO

Niterói, RJ

2018

Ficha catalográfica automática - SDC/BFV

P659m Pinto, Pedro Henrique Nicolau
 MÉTODOS DE SELEÇÃO DE DOADORAS, AVALIAÇÃO E REPETIBILIDADE
 DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS /
 Pedro Henrique Nicolau Pinto ; Felipe Zandonadi Brandão,
 orientador ; Jeferson Ferreira da Fonseca, coorientador.
 Niterói, 2018.
 100 f. : il.

 Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,
 2018.

 1. Reprodução animal. 2. Produção intelectual. I.
 Título II. Brandão, Felipe Zandonadi, orientador. III.
 Fonseca, Jeferson Ferreira da, coorientador. IV. Universidade
 Federal Fluminense. Faculdade de Veterinária.

CDD -

Bibliotecária responsável: Ana Claudia Ferreira Messias - CRB7/5786

PEDRO HENRIQUE NICOLAU PINTO

MÉTODOS DE SELEÇÃO DE DOADORAS, AVALIAÇÃO E REPETIBILIDADE
DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

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

Aprovado em 22 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão - UFF – Orientador

Prof^a. Dr^a. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan – UFF

Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro – UFF

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos Oliveira – UFRRJ

Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello – UFRRJ

Niterói, RJ

2018

Dedico esta tese à minha família e aos meus professores

*“Toda modificação para melhor reclama luta,
tanto quanto qualquer ascensão exige esforço”*
(Emmanuel)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e sempre abrir portas para oportunidades incríveis.

Ao meu Avô, Pedro Nicolau Pinto, pelo incentivo ao estudo, apoio e conselhos.

À minha família: meus pais André Luiz Amâncio Pinto e Vera Lúcia Pinto e irmãos Carolina Gabriele Spinardi Pinto e Rafael Luiz Emmanoel Pinto pelo incentivo e demonstrações de amor e carinho durante toda a minha caminhada.

À minha noiva Carine Dall`Agnol Gianezini pela paciência, carinho e ajuda durante tantos finais de semana onde a programação era o estudo ou redação científica. O seu profissionalismo e disciplina com o trabalho são um exemplo para mim. Assim como sua perseverança, coragem e calma diante dos obstáculos. Me sinto agraciado por poder caminhar com alguém com os seus valores. Sei que com você ao meu lado posso ir mais longe e me sentir completo. Carine, obrigado pelo apoio, sorrisos e ternura diante dos momentos difíceis.

Aos meus tios, tias, primos e primas e sobrinhos pelos gestos de carinho e constantes votos de sucesso.

Aos meus amados e hoje, fisicamente ausentes, Vô Avelino Peppes do Valle, Vó Ilze Terezinha do Valle e Vó Marli Ribeiro Pinto. Trago enraizado em mim o amor de vocês.

Ao meu orientador e amigo Professor Felipe Zandonadi Brandão, por ter aberto a oportunidade do doutorado, pelos conhecimentos passados e pela preocupação em propiciar as melhores condições experimentais para a execução deste doutorado. Obrigado também pelo suporte e preocupação com as minhas condições na fazenda, pela compreensão e ajuda para conciliar as questões da minha vida pessoal, muito além do esperado em uma relação entre aluno e orientador. A sua entrega ao trabalho é um exemplo que levo comigo.

Ao meu coorientador e amigo Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca, que tem participado de quase toda minha trajetória acadêmica: estágio de conclusão de curso, mestrado e, agora, doutorado. É muito bom poder aprender com o senhor e desfrutar da sua companhia. Sua ajuda, orientação e, por vezes, compreensão têm sido extremamente importantes na minha vida profissional e pessoal.

Ao meu amigo e, agora, coorientador Mário Felipe Alvarez Balara. Sua dedicação e competência foram fundamentais para o sucesso deste estudo.

Obrigado pela companhia na Fazenda Escola, caronas, jantas e conversas. Conviver com você é uma oportunidade para evoluir técnica e moralmente.

À Professora Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan e ao Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro, pelas preciosas instruções para a produção dos artigos. Obrigado pela paciência e presteza em me ajudar sempre que necessário, fosse em um domingo à noite ou no meio de um feriado. Aprendi muito com vocês e poder contar com colegas tão competentes é um privilégio. Obrigado também pelas agradáveis conversas e dicas para além do ambiente acadêmico.

À Médica Veterinária Ceci Ribeiro Leite pela dedicação, competência e pela agradável companhia. Sua participação foi fundamental para a realização deste estudo.

Aos demais professores que contribuíram para a minha formação ao longo do doutorado, pelo conhecimento passado e harmoniosa convivência. Em especial ao Prof. Walter Lilenbaum, Prof. Gabriel Martins, Prof. Ribrio Batista, Prof. Guilherme Souza, Prof^a Nádia Almosny, Prof. Carlos Vasconcelos, Prof. André Rios, Prof^a Rita Paixão, Prof. Rodolpho Torres Filho e Prof. Daniel Lessa.

Aos meus colegas de pós-graduação: Gláucia, Lilian, Viviane, Vivian, Helena, Luana, Lucas, Gustavo, Samuel, Loara, Alex, Luiza, Isabel e Sarah pela companhia e ajuda. Sem a dedicação e competência destas pessoas, esse estudo não teria sido realizado.

Aos funcionários e técnicos da UFF e Fazenda Escola, em especial ao Lendel, Adriano, Cedenir e Gilson.

À FAPERJ, Embrapa (Projeto 02.13.06.026.00.02) e CNPq (400785/2016-1) por financiar esta pesquisa, e à CAPES pela bolsa de estudo (Capes/Embrapa – proposta 7).

RESUMO

A finalidade da MOTE (múltipla ovulação e transferência de embriões) é aumentar, além dos limites fisiológicos, o número de descendentes de uma fêmea com fenótipo superior. Por isso, a doadora de embriões tem papel central nesta biotécnica. Objetivou-se neste estudo: (1) determinar o(s) melhor(es) método(s) para a seleção de doadoras que produzam mais embriões; (2) validar uma metodologia minimamente invasiva para a avaliação da resposta superovulatória da doadora; e (3) verificar a repetibilidade de resposta de doadoras submetidas a sucessivas superovulações. No primeiro estudo comparou-se a eficiência de quatro métodos para selecionar fêmeas com maior potencial para a MOTE: resposta a uma superovulação com eCG; concentração do hormônio anti-Mülleriano (AMH), contagem de folículos antrais (CFA) e genótipo para a mutação FecG^E. No segundo ensaio avaliou-se o uso da ultrassonografia modo Doppler Colorido (CL_{DOPPLER}) como substituta à laparoscopia (CL_{LAP}) para a contagem de CL em ovelhas superovuladas. No terceiro estudo realizaram-se, em um mesmo grupo de animais, três sucessivos protocolos para a produção *in vivo* de embriões, visando averiguar a repetibilidade de resposta das doadoras. No primeiro estudo, a concentração de AMH e a CFA, ambas realizadas após a sincronização da emergência folicular, foram os métodos mais eficientes para selecionar fêmeas que produzem mais embriões. No segundo ensaio, observou-se uma excelente correlação ($r^2 = 0,89$, $p < 0,05$) entre o número de corpos lúteos determinados pela US Doppler Colorido e pela laparoscopia. No terceiro estudo, a produção de embriões caiu drasticamente após a primeira MOTE e não foi possível determinar em que condições há repetibilidade de resposta à superovulação. Conclui-se que a CFA e a dosagem de AMH (ambas no início da emergência folicular) podem selecionar animais com maior potencial para a produção *in vivo* de embriões. A ultrassonografia modo Doppler Colorido pode substituir a laparoscopia na avaliação de ovelhas superovuladas. Por fim, mais estudos precisam ser conduzidos para determinar em que condições se mantêm uma repetibilidade de resposta da doadora à superovulação.

Palavras-chave: Doppler Colorido, contagem de CL, seleção de doadora, AMH, população folicular, repetibilidade de resposta.

ABSTRACT

The purpose of MOET (multiple ovulation and embryo transfer) is to increase beyond physiological limits, the number of offspring that a female can produce. Therefore, donors play a central role in this biotechnology. The objective of this study was: (1) determine the best method to screen donors that will produce more embryos; (2) to validate a minimally invasive method to evaluate donor's superovulatory response; and (3) to verify the repeatability of response of embryo donors submitted to successive superovulations. In the first study the efficiency of four methods to select donors with good potential for MOET was compared. These methods were: eCG pre-selection test; plasmatic anti-Müllerian hormone (AMH), antral follicles count (AFC) and the genotype for the FecG^E mutation. In the second trial the use of Color Doppler ultrasonography (CL_{DOPPLER}) as a substitute for laparoscopy (CL_{LAP}) for counting CL in superovulated sheep was evaluated. In the third study, ewes underwent three successive protocols for *in vivo* embryo production and the repeatability of the response was evaluated. In the first study, AMH and CFA, both performed at the beginning of a new follicular wave, were the most efficient for selecting donors with good potential for embryo production. In the second study an excellent correlation ($r^2 = 0.89$, $p < 0.05$) was observed between CL_{DOPPLER} and CL_{LAP}. In the third study, embryo production dropped after the first MOET and it could not be determined the conditions where the repeatability of response will occur. It could be concluded that AFC and plasmatic AMH (both determined at the beginning of a new follicular wave) can select ewes with good potential for *in vivo* embryo production. Color Doppler ultrasonography can replace laparoscopy for evaluating superovulated sheep. Finally, more studies should be conducted to determine the conditions in which the repeatability of response to superovulation will occur.

Keywords: Color Doppler, CL count, donor selection, AMH, follicular population, repeatability of response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Ultrassonografia Doppler na produção in vivo de embriões em ovinos ...	24
2.2 Seleção de doadoras	25
2.2.1 Contagem de folículos antrais	26
2.2.2 Pré-seleção com eCG	28
2.2.3 Dosagem do hormônio anti-Mülleriano	29
2.2.4 Bases genéticas que afetam a prolificidade em ovelhas	33
2.3 Repetibilidade de resposta	40
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
6. CAPÍTULO 1.....	54
O hormônio anti-Mülleriano e a contagem de folículos antrais são mais eficientes para selecionar ovelhas com bom potencial para produção “in vivo” de embriões do que a presença da mutação FecG ^E e que o eCG-teste.....	
7. CAPÍTULO 2.....	82
Ultrassonografia modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia para contagem de corpos lúteos em ovelhas superovuladas.....	
8. CAPÍTULO 3.....	93
Tratamentos superovulatórios consecutivos em ovelhas Santa Inês.....	
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
10. CONCLUSÕES	113
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
12. ANEXO	122

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Revisão Bibliográfica

QUADRO 1 — Associações (r e r^2) encontradas em diferentes publicações, entre a contagem de folículos antrais (CFA) e número de corpos lúteos (CLs) e entre CFA e embriões recuperados (ER).

QUADRO 2 — Mutações em genes de prolificidade: BMPR-1B (receptor para proteína óssea morfogenética 1B), BMP15 (proteína óssea morfogenética 15), GDF9 (fator de crescimento e diferenciação 9), B4GALNT2 (beta-1, 4-N-acetil-galactosaminil transferase 2, gene Lacaune), FecX2 (gene de prolificidade X2, gene Woodland), seus efeitos na taxa de ovulação e prolificidade em ovelhas. Gene, raça onde foi encontrado, nome e símbolo do alelo, cromossomo onde está localizado. O efeito na taxa de ovulação e prolificidade é uma comparação entre heterozigotos (A+), homozigotos (AA) e não portadores da mutação (++).

QUADRO 3 — Efeito do FecG^E na prolificidade de ovelhas Santa Inês.

Capítulo 1

TABELA 1 — Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively); accuracy and Kappa coefficient of different methods to select ewes with a high response to superovulation.

TABELA 2 — Data of FSH superovulation treatment (mean $\pm$ SD) from Santa Ines ewe lambs, wild type (+/+) or heterozygous (+/E) for the FecG^E mutation.

Capítulo 2

TABELA 1 — Sensitivity (SENS), Specificity (SPEC), Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV), Kappa index

and area under the ROC curve (AUC) of the color-Doppler UI used for CL count.

Capítulo 3

TABELA 1 — Estrous parameters, number of CL and embryo yields of Santa Ines ewes submitted to three successive, FSH based (200 mg total), superovulation protocols, naturally mated and submitted to surgical embryo recovery. Data are expressed as percentage or mean $\pm$ SD. Maximum and minimum values are presented (max – min) below each data (when applicable).

TABELA 2 — Comparison of the recovery rate in Santa Ines ewe lambs submitted to three successive FSH superovulation. The number of CL were determined by laparoscopy or Color-Doppler ultrasound imaging.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- FIGURA 1 — A intensidade da coloração azul representa as diferentes concentrações de AMH nas células da granulosa. A hipótese científica atual é de que as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) produzidas pelo oócito e teca induzem a síntese de AMH nas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais-pequenos. O FSH em pequenas concentrações (linha tracejada) pode contribuir para aumentar e/ou manter a expressão de AMH. No entanto, altas concentrações de AMH nos folículos antrais-pequenos inibem os efeitos de diferenciação do FSH nas células da granulosa. Com o avanço da esteroidogênese o FSH inibe a expressão de AMH e antagoniza os efeitos estimulatórios das BMPs, levando à diminuição da concentração intrafolicular de AMH. Esta ação inibitória do FSH parece ser mediada pelo aumento da concentração de estradiol em função da maior expressão de CYP19A1. Adaptado de Monniaux et al. (2013).
- FIGURA 2 — Correlação entre o número de folículos antrais e a concentração plasmática de hormônio Anti-Mulleriano em vacas (a) e cabras (b). Cada ponto no gráfico representa um animal. O coeficiente de correlação para vacas e cabras foi 0,79 e 0,89 respectivamente. Adaptado de Monniaux et al., (2011) e Rico et al., (2009).
- FIGURA 3 — Concentração intrafolicular do hormônio anti-mulleriano em folículos antrais de diferentes tamanhos em ovelhas Romanov. Adaptado de Monniaux et al. (2013).

- FIGURA 4 — Desenho esquemático da síntese de AMH em função da fase do folículo ao longo de uma onda de crescimento. Adaptado de Lambert-Messerlin (2015).
- FIGURA 5 — Diferentes estágios do desenvolvimento folicular em ovelhas, com indicação do início de expressão de genes no (a) oócito, (b) células da granulosa e (c) células da teca interna. As setas verticais indicam tanto o momento de início de expressão como também a continuidade da expressão dos genes até o pico pré ovulatório de LH. Adaptado de Montgomery et al. (2001).
- FIGURA 6 — Efeito da perda de função parcial causada pela mutação $FecB^B$ (Booroola) no receptor para proteína morfogenética óssea do tipo 1B (BMPR 1B). A reserva de folículos primordiais é menor, ao nascimento, em borregas $FecB^B/FecB^B$ do que em borregas sem a mutação (+/+). No entanto, a depleção desta população folicular é menor nas ovelhas com a mutação em função da menor taxa de recrutamento (flechas pretas horizontais) dos folículos primordiais. Ovelhas adultas $FecB^B/FecB^B$ possuem mais folículos antrais saudáveis que maturam e são capazes de ovular com um menor diâmetro. Assim, a cada ciclo estral, múltiplas ovulações de oócitos competentes são desencadeadas simultaneamente pelo pico pré ovulatório de LH. A menor atividade das BMPs (em função da mutação nos receptores 1B) diminui a taxa de recrutamento e de atresia folicular (flecha preta em semicírculo) e acelera a diferenciação das células da granulosa (pelo aumento da sensibilidade destas ao FSH) (MONNIAUX 2016). Em ovelhas $FecB^B/FecB^B$ as BMPs não estimulam de forma eficiente a expressão e secreção de AMH nas células da granulosa (ESTIENNE et al., 2015), o que contribui para a sensibilização destas células ao FSH, aumenta o número de

folículos competentes recrutados e acelera a diferenciação final, especialmente a formação de receptores de LH. Adaptado de Monniaux, 2016.

FIGURA 7 — Frequência de múltiplas ovulações (≥ 2 CL) em função do genótipo (E/E homozigose $n = 9$; +/E heterozigose $n = 15$; +/+ sem o alelo $n=15$; para a mutação $FecG^E$) em ovelhas da raça Santa Inês. Grupos com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,001$). Adaptado de Silva et al. (2011).

FIGURA 8 — Desenho esquemático representando o teste de seleção eCG, o protocolo FSH para produção in vivo de embriões e o intervalo empregado entre os protocolos. São indicados ainda, os momentos de coleta de sangue para genotipagem, determinação do hormônio anti-Mülleriano, bem como os momentos da contagem de folículos antrais e da contagem do número de corpos lúteos (por ultrassonografia modo Color Doppler e laparoscopia).

Capítulo 1

FIGURA 1 — Schematic representation of the eCG pre-selection test, FSH superovulation protocol, blood collections for AMH assessment, antral follicle count (AFC), and embryo recovery. A 21-day interval was applied between the end of the eCG test ($D18_{eCG}$) and the beginning of the FSH superovulation protocol ($D0_{FSH}$).

FIGURA 2 — Receiver-operating characteristic (ROC) analysis for determination of the antral follicle count (AFC) threshold for ewe lambs with > 7 corpora lutea after the FSH protocol. Data were obtained from 25 ewe lambs. (A) Sensitivity and specificity curves. Each AFC was selected as a threshold for defining positive and negative test outcomes, ie, ewes with $CL > 7$ and ≤ 7 , respectively, after the FSH protocol.

Diagnostic specificity (Sp) was defined as the probability of a positive test outcome in an individual with CL > 7 after the FSH protocol. Diagnostic sensitivity (Se) was defined as the probability of a negative test outcome in an individual with CL ≤ 7 after the FSH protocol. Data for Se and Sp are expressed as percentages. (B) ROC plot representation of the data. The AFC threshold of 10 maximized the Youden index.

FIGURA 3 — Receiver-operating characteristic (ROC) analysis for determination of the AMH threshold for ewe lambs with > 7 corpora lutea after the FSH protocol. Data were obtained from 25 ewe lambs. (A) Sensitivity and specificity curves. Each AMH concentration was selected as a threshold to define positive and negative test outcomes, ie, ewes with CL > 7 and ≤ 7 respectively, after the FSH protocol. Diagnostic specificity (Sp) was defined as the probability of a positive test outcome in an individual with CL > 7 after the FSH protocol. Diagnostic sensitivity (Se) was defined as the probability of a negative test outcome in an individual with CL ≤ 7 after the FSH protocol. Data for Se and Sp are expressed as percentages. (B) ROC plot representation of the data. The AMH threshold of 168 pg/mL maximized the Youden index.

FIGURA 4 — Comparison of four screening methods used to classify Santa Ines ewe lambs as having low potential of response (LR) or high potential of response (HR) for in vivo embryo production. The screening methods were: **A**— CL count after a pre-selection eCG test (eCG); **B**— antral follicle count, evaluated at the first FSH dose (AFC); **C**— plasma anti-Müllerian hormone, evaluated at administration of the first FSH dose (AMH); **D**— presence of one allele (+/E), or absence of the *FecGE* mutation (+/+). Thresholds used for each screening method are indicated. CL count, total number

of recovered structures (Rec Struc) and number of viable embryos (Viab Emb) after an FSH-based superovulation are presented.

Capítulo 2

FIGURA 1 — Subjective CL vascularization scores (1 to 4) based on the luteal area percentage (0-100%) with colored pixels. Score 1 (0-25%), Score 2 (25-50%), Score 3 (50-75%), and Score 4 (75-100%).

FIGURA 2 — Scatterplot showing the correlation ($p < 0.05$) between the CL counted by color-Doppler ultrasound imaging ($CL_{DOPPLER}$) and by laparoscopy (CL_{LAP}) in superovulated sheep.

FIGURA 3 — Color-Doppler ultrasound imaging of superovulated ovaries in sheep: A - poor response (2 CL) and B - good response (4 CL). Black star indicates ovarian vessels at the hilum. White dashed circles indicate each CL.

Capítulo 3

FIGURA 1 — Schematic representation of the FSH SOV protocol, intervals among SOV treatments, and moment of CL count by Color-Doppler ultrasound imaging and laparoscopy. PROG = progestogen (60 mg of medroxyprogesterone acetate).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMH	Hormônio Anti-Mülleriano
ANOVA	Análise de Variância
AUC	Área sob a curva ROC
AMHR2	Receptores do tipo 2 para AMH
B4GALNT2	Beta-1, 4-N-acetil-galactosaminil transferase 2, gene Lacaune
BMP(s)	Proteínas ósseas morfogenéticas
BMP15	Proteína óssea morfogenética 15
BMPR-1B	Receptor para proteína óssea morfogenética 1B
CFA	Contagem de folículos antrais
CL	Corpo lúteo
CLs	Corpos lúteos
DMPBS	Solução Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Emb	Embrião
ER	Estruturas recuperadas
EUA	Estados Unidos da América
FeB ^B	Mutação Booroola
FecG ^E	Gene de prolificidade Embrapa
FecX2	Gene de prolificidade X2, gene Woodland
FecX ^R	Gene de prolificidade – Raça Aragonesa
FN	Falso negativo
Fol cont	Folículos contabilizados
FP	Falso positivo
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Força gravitacional
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação 9
IA	Inseminação artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Índice de correlação intraclasse
im	Intramuscular

iv	Intravenoso
Kg	Quilograma
KHz	Quilohertz
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
Mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embrião
NI	Não informado
ng	Nanograma
NPV	Valor preditivo negativo
NS	Não significativo
Obs	Observação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picograma
PPV	Valor preditivo positivo
PRF	Frequência de repetição de pulsos
r	Coeficiente de correlação de Pearson
r ²	Coeficiente de determinação
Recp	Recuperadas
RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
ROC	Teoria de detecção de sinais
SAEG	Sistema para Análises Estatísticas
SC	Sem correlação
SD	Desvio padrão
SENS	Sensibilidade
SI	Santa Inês
SOV	Superovulação
SPEC	Especificidade
SPSS	Pacote estatístico para as ciências sociais

TE	Transferência de embriões
TGFβ	Fatores de crescimento transformantes beta
TN	Verdadeiro negativo
TP	Verdadeiro positivo
UniPECO	Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos
UI	Imagem de ultrassom
US	Ultrassonografia
Viav	Viáveis
WF	Filtro de parede
°	Graus
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura fornece uma importante fonte de proteína animal e é uma opção de negócio para propriedades de diferentes tamanhos e níveis de tecnificação. Ainda, os ovinos podem ser utilizados para a produção de biofármacos e servem como modelo experimental em diversas áreas de pesquisa básica, incluindo a medicina humana. Atualmente, o rebanho brasileiro de ovinos ultrapassa os 18 milhões de cabeças, sendo 60,6% deste rebanho na Região Nordeste e 26,5% na Região Sul do país e desde 2012 o número de animais vem aumentando (IBGE, 2015). Atualmente a raça Santa Inês é a mais criada no território nacional (AGUIRRE et al., 2016). Algumas características desta raça como habilidade materna e prolificidade fazem dela uma ótima opção como base materna para cruzamentos com outras raças (BALARO et al., 2014).

Na produção de pequenos ruminantes, as biotécnicas reprodutivas como por exemplo a múltipla ovulação e transferência de embrião (MOTE), foram introduzidas para transpor limitações fisiológicas inerentes às cabras e ovelhas e acelerar o ganho genético (COGNIÉ et al., 2003). A MOET permite uma maior disseminação genética, tanto de machos como de fêmeas, com fenótipo superior (VERMA et al., 2012). A técnica baseia-se na superestimulação ovariana por meio de protocolos hormonais à base de gonadotrofinas (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004). Esta superestimulação hormonal induz múltiplas ovulações, permitindo que um número elevado de oócitos esteja passível de fertilização. Entre seis a sete dias após a fecundação destes oócitos (seja por inseminação artificial ou monta natural) os embriões são recuperados. O último passo da MOTE é a inovulação dos embriões recuperados das doadoras em receptoras previamente preparadas (FONSECA et al., 2016). O impacto da MOTE é evidente nos programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como no resgate e conservação de raças ameaçadas de extinção, e também no apoio a outras biotécnicas relacionadas (OLIVEIRA, 2011). Ainda, a MOTE é uma importante ferramenta para aumentar a disseminação de características produtivas de fêmeas superiores. Também, pode acelerar testes de progênie, permitir o intercâmbio genético para outras regiões ou países com segurança sanitária elevada e sem os riscos e custos do transporte de animais vivos (BRASIL et al., 2014).

Em ovinos, um dos grandes entraves para a aplicação da MOTE é a grande variabilidade de resposta da doadora frente à superovulação (SOV). Esta variação é o maior desafio para o aumento da eficiência dos programas de MOTE e é responsável também pelo incremento no custo por embrião produzido (COGNIÉ et al., 2003; BARTLEWSKI et al., 2008; GIBBONS et al., 2010; OLIVEIRA, 2011; BRUNO-GALARRAGA et al., 2015). Associado a este gargalo, ainda existe a necessidade de etapas cirúrgico-anestésicas, o que também dificulta e encarece a dispersão da MOTE na ovinocultura. Assim, existe uma importante demanda por técnicas que permitam selecionar animais que terão um desempenho satisfatório na produção *in vivo* de embriões. Uma vez identificados os animais que produzam mais embriões, é fundamental verificar se este potencial de resposta é constante e se perpetua em protocolos sucessivos de SOV. Ainda, um importante progresso para a MOTE seria diminuir o número de etapas cirúrgicas, simplificando o procedimento, da mesma forma como avançou a transferência de embriões em bovinos (FONSECA et al., 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ultrassonografia Doppler na produção *in vivo* de embriões em ovinos

Desde os primeiros estudos surgidos na década de 80, a ultrassonografia (US) Modo-B tem permitido a investigação dos eventos reprodutivos em animais de maneira minimamente invasiva (GINTHER et al., 2014). Um progresso bastante importante, quando se tem em vista que os estudos anteriores que visavam elucidar eventos reprodutivos, comumente submetiam os animais a repetitivos procedimentos cirúrgicos (DUFOR et al., 1972). A partir da década de 90, a US modo-B se consolidou como uma importante ferramenta para a pecuária (MYAMOTO et al., 2006). Apesar de não ser tão usual quanto a US Modo-B, a US Doppler (espectral e Doppler colorido) permitiu uma nova abordagem para estudar as funções reprodutivas nos animais, uma vez que tornou possível avaliar, também de forma não invasiva e em tempo real, o fluxo vascular de órgãos e estruturas do sistema reprodutor (MYAMOTO et al., 2006; GINTHER et al., 2014). No início do século XXI, houve um aumento de publicações utilizando a US Doppler, voltadas principalmente para a fêmea bovina (BOLLWEIN et al., 2016).

Em pequenos ruminantes, o uso da US Doppler é ainda mais recente e tem sido aplicada para estudar a funcionalidade luteal e para a determinação dos parâmetros vasculares durante a gestação (FIGUEIRA et al., 2015; ELMETWALLY et al., 2016; BALARO et al., 2017). Figueira et al. (2015) confirmaram que em ovelhas Santa Inês, há correlação positiva entre a área valcularizada determinada pela US Doppler e a concentração de progesterona, durante a luteogênese e luteólise ($r = 0,22$ e $r = 0,48$, respectivamente). Os mesmos autores também reportaram que a presença do corpo lúteo pôde ser detectada precocemente, aproximadamente um dia após a ovulação. Esta informação tem uma importante aplicabilidade para a biotécnica de MOTE, pois permite uma avaliação precoce e bastante precisa da receptora. Da mesma forma, em bovinos, foi reportada a eficiência da US Doppler para distinguir CL funcionais de não funcionais (BOLLWEIN et al., 2016). A seleção das receptoras mais aptas a receberem os embriões, ou seja, com boa função luteal e livres de

enfermidades, aumenta as chances de gestação, permitindo alcançar taxas de até 80% em ovinos (SANTIAGO-MORENO et al., 2001). Além disso, elimina-se a necessidade de realizar a laparoscopia para avaliar o CL da receptora. Assim, a supressão de etapas cirúrgicas é uma tendência que deve ser estimulada nas biotécnicas da reprodução (FONSECA et al., 2016).

Recentemente, dois experimentos foram conduzidos para avaliar o uso da US Doppler na predição da resposta superovulatória e na produção de embriões em ovelhas. O primeiro estudo descreveu que a avaliação subjetiva da intensidade da vascularização folicular não possui correlação com resposta à superovulação. No entanto, uma avaliação quantitativa da área total de vascularização folicular, avaliada no último dia de tratamento superovulatório, foi correlacionada com a quantidade de estruturas não fertilizadas ($r = 0.68$; $P < 0,05$) (OLIVEIRA et al., 2014). Apesar da correlação moderada encontrada, o potencial de resposta da doadora somente seria reconhecido ao final do protocolo superovulatório, quando já ocorreu o investimento hormonal. Já no segundo estudo, foram relatadas correlações fortes entre a velocidade do fluxo sanguíneo folicular (no Dia 1 do tratamento superovulatório) com o número de CL ($r = 0,92$; $P < 0,0002$) e com o número de embriões viáveis produzidos ($r = 0,77$; $P < 0,01$) (OLIVEIRA et al., 2017). Tais achados foram bastante promissores e configuraram a US Doppler como uma ferramenta capaz de prever o potencial de resposta de uma ovelha já no início de um protocolo superovulatório.

2.2 Seleção de doadoras

A grande variabilidade de resposta dos ovinos frente a protocolos superovulatórios aumenta os custos vinculados à biotécnica de produção de embriões *in vivo*, assim como compromete o número de adeptos a implementação da técnica dentro de programas de melhoramento animal em rebanhos comerciais (BARTLEWSKI et al., 2008; BARTLEWSKI et al., 2016). Visando atenuar o viés na variabilidade de resposta em ovelhas, tem-se buscado metodologias que permitam selecionar animais com maior potencial de resposta à SOV. Algumas das técnicas em estudo com esta finalidade são: a contagem

de folículos antrais (CFA) por ultrassonografia, pré-estimulação com eCG, dosagem do hormônio anti-Mülleriano (AMH) e genotipagem (DUFOR et al., 2000; COGNIE et al., 2003; LAHOZ et al 2014; BRUNO-GALARRAGA et al., 2015). Adicionalmente, além da variabilidade existente entre doadoras num mesmo protocolo de SOV, também é descrita a variabilidade de resposta de uma mesma doadora em protocolos subsequentes de SOV. Assim, a repetibilidade de resposta à SOV, também é outro marcador que vem sendo estudado (BRUNO-GALARRAGA et al., 2014).

2.2.1 Contagem de folículos antrais

A possibilidade de se determinar de forma precisa a população de pequenos folículos antrais tem uma importante aplicabilidade no cenário das biotécnicas reprodutivas. As correlações entre reserva folicular, fertilidade e potencial de resposta a protocolos hormonais, têm despertado, o interesse de vários pesquisadores no segmento (IRELAND et al., 2007; PONTES et al., 2009; MOSSA et al., 2012; SILVA-SANTOS et al., 2014).

Martinez et al. (2016) estudando vacas leiteiras da raça Holandês e Jersey, criadas à pasto na Nova Zelândia, descreveram que os animais com maior CFA tiveram menor período de serviço, quando comparados com outros de baixa CFA ($82,4 \pm 1,6$ vs $87,3 \pm 1,2$ dias, respectivamente; $p < 0,05$). No mesmo estudo, os animais com alta CFA tiveram maior taxa de prenhez à primeira inseminação do que os animais de baixa CFA (68% vs. 45,3%; $p < 0,05$).

É descrita uma maior produção de embriões em vacas com maior CFA (SILVA-SANTOS et al., 2014; BARUSELLI et al., 2015) e menor desempenho reprodutivo em fêmeas bovinas com menor CFA (IRELAND et al., 2007; MOSSA et al., 2012). Ainda, Santos et al., (2016) verificaram que vacas Nelore com maior CFA produziram mais embriões viáveis do que fêmeas de baixa CFA ($18,4 \pm 6,7$ vs. $6,1 \pm 3,6$, respectivamente; $p < 0,05$). Em bovinos cruzados (*indicus* vs. *taurus*), foi descrito que seria possível selecionar fêmeas com maior potencial para a produção de embriões (tanto *in vivo* como *in vitro*) por meio de uma única avaliação ultrassonográfica visando a identificação de animais com maior população folicular (SILVA-SANTOS et al., 2014).

Na espécie ovina, também têm sido avaliadas as correlações entre CFA e potencial de resposta à superovulação (Quadro 1), mas os resultados obtidos não vêm sendo unânimes e apontam para algumas particularidades. Alguns estudos verificaram correlações significativas entre a CFA, no momento da SOV, com o número de embriões produzidos *in vivo* (COGNIÉ et al., 2003; GONZALES-BULNES et al., 2002). Porém, Bartlewski et al. (2008) não encontraram correlação entre a CFA na primeira dose de FSH, com a resposta à superovulação na contra estação reprodutiva. No entanto, 12 h após a primeira aplicação de FSH, o número de folículos de tamanho mediano (≥ 4 mm) apresentou correlação com o número de CLs e estruturas viáveis recuperadas.

Quadro 1. Associações (r e r^2) descritas na literatura, entre a contagem de folículos antrais (CFA) e o número de corpos lúteos, estruturas ou embriões viáveis em ovelhas submetidas à superovulação

Autor	Momento da CFA	Fol Cont	Associação	P
Gonzalez-Bulnes et al., 2002	1ª FSH	2 - 3 mm	$r^2=0,22$ (CFA x CLs)	$P<0,05$
Gonzalez-Bulnes et al., 2002	1ª FSH	2 - 3 mm	$r^2=0,22$ (CFA x Emb Recp)	$P<0,01$
Cognié et al., 2003	1ª FSH	2 - 3 mm	NI (CFA x CL)	$P<0,05$
Bartlewski et al., 2008	1ª FSH	≥ 2 mm	SC (CFA x CL)	$P>0,05$
Bartlewski et al., 2008	2ª FSH	4 mm	$r=0,44$ (CFA x CLs)	$P<0,05$
Bartlewski et al., 2008	2ª FSH	4 mm	$r=0,45$ (CFA x Emb Recp)	$P<0,05$
Veiga Lopez et al., 2005	1ª FSH	2 - 3 mm	$r^2=0,37$ (CFA x CLs)	$P<0,005$
Veiga Lopez et al., 2005	1ª FSH	3 mm	$r^2=0,30$ (CFA x Emb Recp)	$P<0,05$
Veiga Lopez et al., 2005	1ª FSH	3 mm	$r^2=0,35$ (CFA x Emb Viáv)	$P<0,05$
Bruno-Galarraga et al., 2015	1ª FSH	2- 4 mm	SC (CFA x CL)	$P>0,05$
Bruno-Galarraga et al., 2015	1ª FSH	≥ 2 mm	SC (CFA x CL)	$P>0,05$

Fol Cont – folículos contabilizados; CFA – contagem de folículos antrais; CLs – corpos lúteos; Emb Recp – embriões totais recuperados; Emb Viáv – embriões viáveis recuperados; SC – sem correlação; NI – não informado.

Outro estudo avaliando a CFA e resposta à SOV encontrou correlação significativa ($p < 0,01$) entre a CFA (medindo de 2 a 3 mm) e a taxa de ovulação.

Entretanto, somente encontrou-se correlação ($p < 0,05$) da população de folículos de 3 mm com o número de embriões produzidos e sua viabilidade (VEIGA-LOPEZ et al., 2005). Tal achado, indicou que talvez apenas um grupo específico de folículos possa ser relacionado à resposta à SOV em ovinos. Além destas particularidades, o efeito benéfico da maior CFA no início da superovulação em ovinos não tem se mostrado constante. Bruno-Galarraga et al. (2015) não encontraram, na estação reprodutiva, correlação significativas entre a CFA e a taxa de ovulação. Ainda com relação à CFA no início do tratamento superovulatório, diferentes grupos de pesquisa têm demonstrado o efeito negativo da presença de folículos grandes no início da SOV com a posterior produção de embriões viáveis (RUBIANES et al., 1995; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002; VEIGA-LOPEZ et al., 2005; BRUNO-GALARRAGA et al., 2015). Por outro lado, na contra estação, o efeito deletério da presença de folículos grandes não parece ter um efeito negativo, conforme demonstrado por González-Bulnes et al. (2003).

Assim, apesar dos vários relatos de que a CFA pequenos e grandes (≥ 4 mm) favorece e prejudica, respectivamente, a resposta à SOV em ovelhas, mais estudos precisam ser conduzidos para que estes fenômenos sejam esclarecidos e seu uso para a seleção de doadoras seja devidamente orientado (Bartlewski et al., 2016).

2.2.2 Pré-seleção com eCG

Observou-se em humanos, que era possível identificar mulheres com resposta satisfatória ou ruim na produção *in vitro* de embriões após aplicação única de FSH no dia 3 do ciclo menstrual (FANCHIN et al., 1994). Em ovinos, estudos apontaram que o uso de uma única dose de FSH ou de eCG poderiam também ser utilizados para identificar, na pré-puberdade, animais mais prolíficos e bom potencial para produção de embriões (DAVIS & JOHNSTONE 1985; TORRES-ROVIRA et al., 2014). Seguindo esta linha de estudo para seleção de doadoras, foi recentemente proposto por Bruno-Galarraga et al. (2015) que ovelhas adultas que apresentassem maior número de CLs após uma única aplicação de eCG (800UI) teriam maior potencial de resposta à uma posterior

superovulação com FSH. Foi encontrada uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre o número de CLs após o eCG com o número de CLs produzidos após uma SOV padrão à base de FSH ($r = 0,79$), além de uma elevada taxa de recorrência (84%) e maior produção de embriões pelas fêmeas classificadas como de alta resposta em relação às de baixa ($7,2 \pm 3,7$ vs. $4,0 \pm 3,9$, respectivamente; $P < 0,05$). Um estudo recente, utilizando o mesmo conceito para a seleção de cabras, relatou que 70% dos animais mantiveram sua classificação (alta ou baixa resposta) após este procedimento de triagem. Igualmente, verificou-se uma correlação moderada pelo coeficiente Kappa ($\kappa = 0,40$; $p < 0,05$) (Balara et al., 2016).

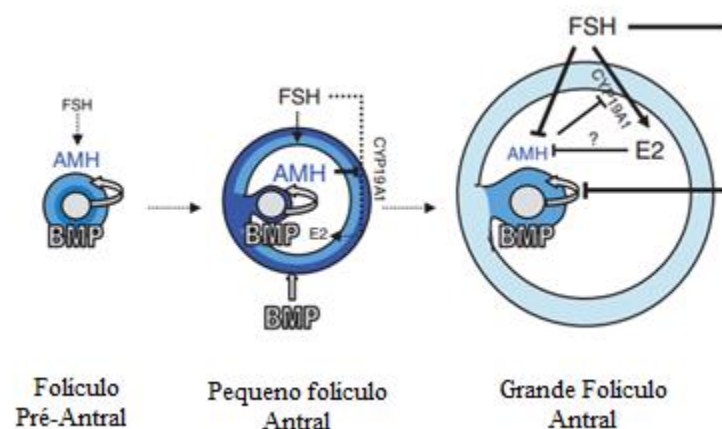
2.2.3 Dosagem do hormônio anti-Mülleriano

A primeira suposição da existência do Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) foi postulada por Alfred Jost em 1947, para explicar a regressão, durante a diferenciação sexual, dos ductos de Muller (MOMMIAUX et al., 2013). Atualmente, existem várias linhas de estudo para elucidar os efeitos reprodutivos e talvez sistêmicos que este hormônio exerce em animais e também em humanos (ANDERSON et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014; CLAES et al., 2016). O AMH é uma glicoproteína dimérica, membro da superfamília dos fatores de transformação do crescimento beta (TGF- β) em inglês *transforming growth factor* (LA MARCA e VOLPE, 2006). É produzido exclusivamente pelas gônadas nas células de Sertoli e nas células de granulosa (LA MARCA e VOLPE 2006; LA MARCA et al., 2009).

Nos ovários, a síntese de AMH e de receptores do tipo 2, específicos para este hormônio (AMHR2), parece ser regida pelas proteínas da superfamília TGF β , produzidas pelo oócito (POOLE et al., 2016). O hormônio anti-mulleriano é capaz de regular as funções das células da granulosa durante o período de recrutamento folicular (ILHA et al., 2016) diminuindo a responsividade dos folículos ao estímulo de crescimento induzido pelo FSH (DURLINGER et al., 2001). Com o crescimento folicular e consequente diminuição das concentrações de AMH, o folículo se torna mais responsivo ao FSH e entra para o *pool* de folículos que poderão se tornar dominantes (VISSER e THEMMEN, 2014). Desta

forma, talvez o principal efeito parácrino do AMH seja impedir o recrutamento e desenvolvimento de folículos primordiais, assegurando assim uma maior longevidade reprodutiva para a fêmea, que não esgota sua reserva folicular precocemente (DURLINGER et al., 1999; 2002). Os principais mecanismos de ação e produção do AMH estão resumidos na Figura 1.

Figura 1. A intensidade da coloração azul representa as diferentes concentrações de AMH nas células da granulosa. A hipótese científica atual é de que as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) produzidas pelo oócito e teca induzem a síntese de AMH nas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais pequenos. O FSH em pequenas concentrações (linha tracejada) pode contribuir para aumentar e/ou manter a expressão de AMH. No entanto, altas concentrações de AMH nos folículos antrais pequenos inibem os efeitos de diferenciação do FSH nas células da granulosa. Com o avanço da esteroidogênese o FSH inibe a expressão de AMH e antagoniza os efeitos estimulatórios das BMPs, levando à diminuição da concentração intra-folicular de AMH. Esta ação inibitória do FSH parece ser mediada pelo aumento da concentração de estradiol em função da maior expressão de CYP19A1. Adaptado de Monniaux et al. (2013).



Monniaux et al. (2011) e Rico et al. (2009) demonstraram que a produção de AMH acontece principalmente em folículos pré-antrais e antrais pequenos. Sendo que as maiores concentrações plasmáticas de AMH são encontradas em

vacas com maior número de folículos entre 3 à 7 mm, em cabras com maior população de folículos entre 1 à 5 mm (Figura 2), e em ovelha com folículos de 1 à 3 mm (Figura 3; RICO et al., 2009; MONNIAUX et al., 2011).

Figura 2. Correlação entre o número de folículos antrais e a concentração plasmática de hormônio Anti-Mulleriano em vacas (a) e cabras (b). Cada ponto no gráfico representa um animal. O coeficiente de correlação para vacas e cabras foi 0,79 e 0,89 respectivamente. Adaptado de Monniaux et al. (2011) e Rico et al. (2009).

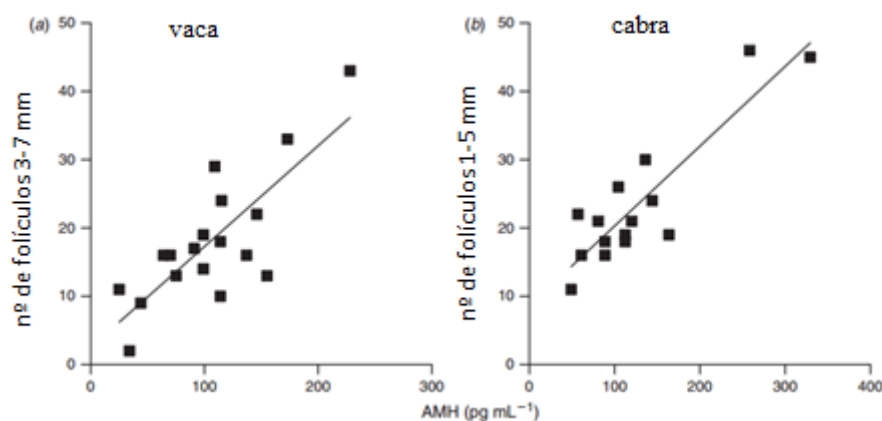
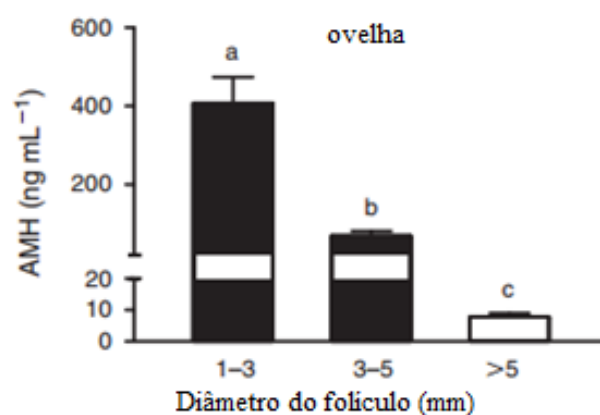
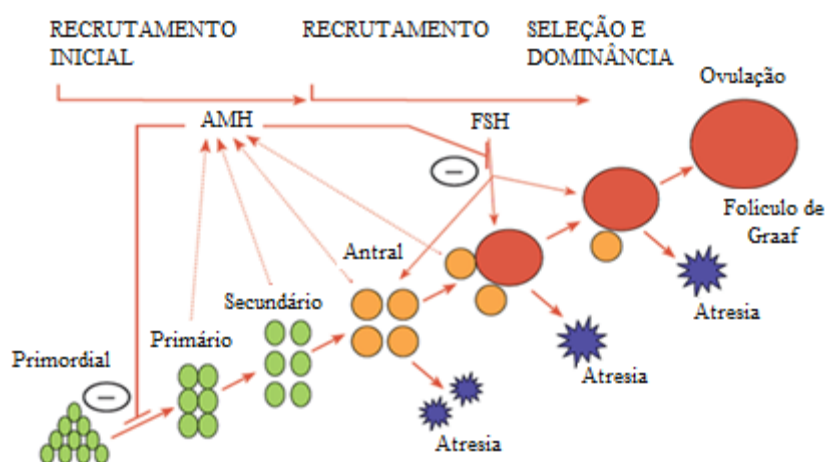


Figura 3. Concentração intra-folicular do hormônio anti-mulleriano em folículos antrais de diferentes tamanhos em ovelhas Romanov. Adaptado de Monniaux et al. (2013).



De acordo com Monniaux et al. (2011) e Rico et al. (2009), também existe uma correlação positiva entre a concentração de AMH no líquido intrafolicular com a concentração sérica de AMH no plasma sanguíneo. Correlações moderadas a fortes entre a CFA e a concentração plasmática de AMH foram relatadas também em búfalos, bovinos taurinos e zebuínos ($r=0,62$; $r=0,66$; $r=0,88$; respectivamente) (BALDRIGHI et al., 2014). Estes achados permitiram concluir que a dosagem sérica de AMH se configura como um marcador endócrino da população de pequenos folículos antrais nos ruminantes (RICO et al., 2009; MONNIAUX et al., 2011; BALDRIGHI et al., 2014). Neste contexto, a produção de AMH em função da fase de crescimento folicular está esquematizada na Figura 4.

Figura 4. Desenho esquemático da síntese de AMH em função da fase do folículo ao longo de uma onda de crescimento. Adaptado de Lambert-Messerlin (2015).



Ribeiro et al. (2014) estudando as concentrações séricas de AMH em vacas leiteiras adultas ($n=1237$), constataram que as concentrações de AMH se mantêm constantes independente da fase do ciclo estral. Todavia, variaram muito entre indivíduos da mesma raça e entre diferentes raças, sendo a vaca Jersey a que apresentou as maiores concentrações de AMH. Foi verificado também que as fêmeas possuem diferentes perfis de AMH em função da ordem de parição. Outro achado bastante interessante foi que os animais com as

menores concentrações de AMH tiveram maiores índices de perda gestacional entre 35 e 65 dias de gestação.

Em bovinos, a concentração plasmática de AMH tem sido utilizada para selecionar fêmeas com melhor desempenho em protocolos superovulatórios e maior produção de embriões (RICO et al., 2009; MONNIAUX et al., 2010; GUERREIRO et al., 2014). Tem-se demonstrado alta correlação entre as concentrações séricas de AMH e fertilidade também em humanos (ZEC et al., 2011), equinos (VERNUNFT et al., 2013) e búfalos (LIANG et al., 2016). Ainda, já se comprovou em cabras que o AMH pode ser utilizado para selecionar doadoras com maior potencial de produção *in vivo* de embriões de alta qualidade (MONNIAUX et al., 2011).

Em ovelhas jovens, é descrita uma correlação diretamente proporcional entre a CFA e a concentração de AMH, além de maior capacidade de resposta a protocolos superovulatórios e maior produção de oócitos em ovelhas com maior concentração sérica de AMH (LAHOZ et al., 2014; TORRES-ROVIRA, et al., 2014). Estes achados são bastante promissores, e o uso do AMH como biomarcador para fertilidade fica cada dia mais consolidado.

Além das aplicabilidades voltadas à reprodução animal, o AMH vem trazendo contribuições também para a medicina humana. A concentração sérica de AMH pode ser utilizada em humanos para diagnóstico da síndrome do ovário policístico, para determinar o grau de resposta de uma mulher a um tratamento superovulatório, determinar a longevidade reprodutiva e modular a “intensidade” de tratamentos superestimulatórios (LA MARCA et al., 2009; LAMBERT-MESSERLIAN, 2015). Existem também especulações de que o tratamento com uma fonte exógena de AMH poderia bloquear o crescimento folicular, configurando uma nova estratégia para contracepção e talvez, de forma mais importante, atrasar o processo de envelhecimento reprodutivo (LA MARCA et al., 2009), o que daria às mulheres uma maior janela de tempo para planejar uma gravidez.

2.2.4 Bases genéticas que afetam a prolificidade em ovelhas

Por meio da avaliação do desempenho reprodutivo natural, sem interferência de protocolos hormonais, é possível constatar que alguns animais, raças ou até mesmo rebanhos apresentam diferentes taxas de ovulação e prolificidade (SHRESTHA & HEANEY 1990; SILVA et al., 2011). Uma maneira bastante prática de constatar estas diferenças é por meio da observação da frequência de partos gemelares. Em rebanhos Santa Inês, por exemplo, têm sido observados índices de prolificidade entre 1,1 e 1,4 (LIMA et al., 1985; PINHEIRO, 2004).

A primeira suposição de que genes e suas mutações estariam influenciando a taxa de ovulação e o tamanho da prole em ovelhas, se deu na década de 80 na Austrália, em ovelhas da raça Merino da linhagem Booroola (DAVIS et al., 1982). A partir deste achado, vários outros estudos foram conduzidos na tentativa de identificar quais seriam as mutações e genes responsáveis pelas diferentes taxas de ovulação e, conseqüentemente, maior prolificidade nos rebanhos (GALLOWAY et al., 2000; MONTGOMERY et al., 2001; SOUZA et al., 2001; MULSANT et al., 2001, DAVIS et al., 2005; PRAMOD et al., 2013) No Quadro 2 estão relacionadas as principais mutações encontradas em ovelhas, com a repercussão na taxa de ovulação e prolificidade.

Quadro 2. Mutações em genes de prolificidade: BMPR-1B (receptor para proteína óssea morfogenética 1B), BMP15 (proteína óssea morfogenética 15), GDF9 (fator de crescimento e diferenciação 9), B4GALNT2 (beta-1, 4-N-acetil-galactosaminil transferase 2, gene Lacaune), FecX2 (gene de prolificidade X2, gene Woodland), seus efeitos na taxa de ovulação e prolificidade em ovelhas. Gene, raça onde foi encontrado, nome e símbolo do alelo, cromossomo onde está localizado. O efeito na taxa de ovulação e prolificidade é uma comparação entre heterozigotos (A+), homozigotos (AA) e não portadores da mutação (++)

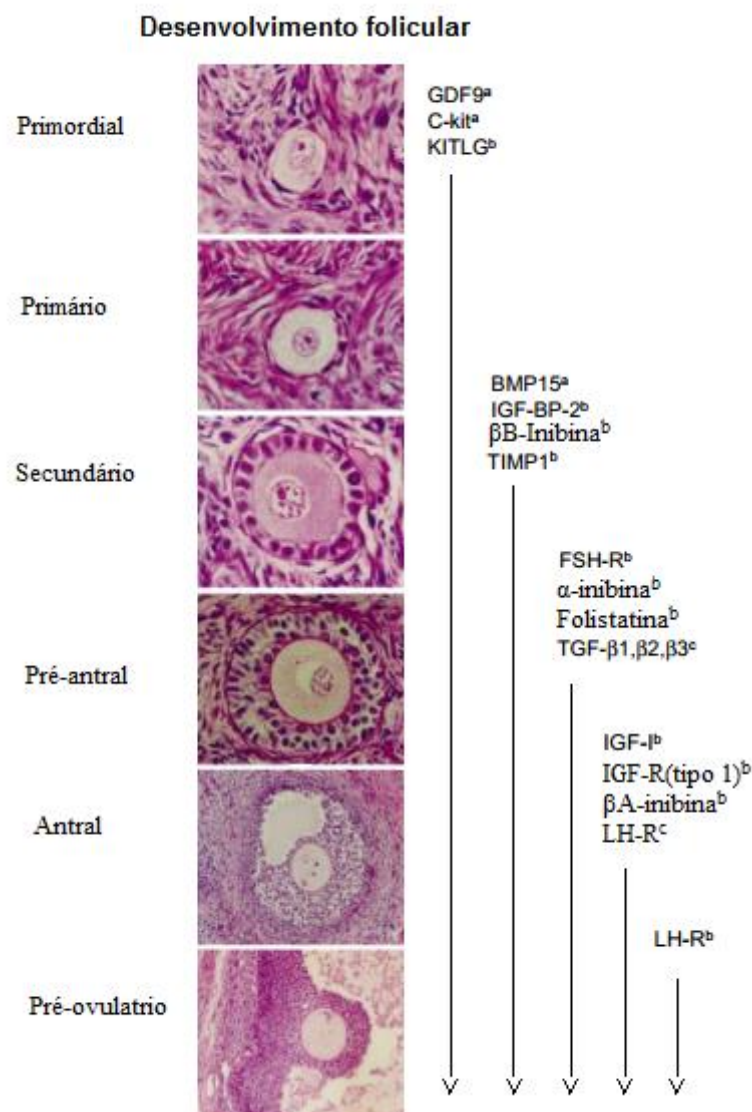
Gene	Raça	Nome e sigla do alelo	Cromossomo	Taxa de ovulação	Prolificidade
BMPR-1B	Booroola Merino, (Garole)	Booroola, FecBB	6	B+: +1.3 BB: +3.6	B+: +0.7 BB: +0.8
BMP15	Romney	Inverdale, FecXI	X	I+: +1.0 II: infertile	I+: +0.6 II: infertile
BMP15	Romney	Hanna, FecXH	X	H+: +1.0 HH: infertile	H+: +0.6 HH: infertile
BMP15	Belclare	Belclare, FecXB	X	B+: +1.0 BB: infertile	BB: infertile
BMP15	Belclare and Cambridge	Galway, FecXG	X	G+: +0.7 GG: infertile	GG: infertile
BMP15	Lacaune	Lacaune, FecXL	X	L+: +2.0 LL: infertile	- LL: infertile
BMP15	Rasa Aragonesa	Rasa Aragonesa, FecXR	X	- RR: infertile	R+: +1.3 RR: infertile
BMP15	Grivette	Grivette, FecXGr	X	- -	Gr+: +1.9 GrGr: +2.5
BMP15	Olkuska	Olkuska, FecXO	X	O+: +2.0 OO: +3.3	--
GDF9	Belclare and Cambridge	High Fertility, FecGH	5	H+: +1.4 HH: infertile	HH: infertile
GDF9	Icelandic	Thoka, FecGT	5	I+: +1.2 II: infertile	I+: +0.7 II: infertile
GDF9	Santa Inês	Embrapa, FecGE	5	- EE: +1.0	- EE: +0.7
GDF9	Norwegian white sheep (Finnsheep)	-	5	- -	N+: +0.2 NN: +0.5
B4GALNT2	Lacaune	Lacaune, FecLL	11	L+: +1.5 LL: +3.0	L+: +1.0 LL: +2.0
FecX2	Coopworth	Woodland, FecX2W	X	W+: +0.4 WW: ≥ +0.4	W+: +0.3 WW: ≥ +0.3

Adaptado de Jansson, T. (2004).

Os genes mutantes de prolificidade regem parcialmente o desenvolvimento folicular, codificando proteínas que atuam como fatores de crescimento e receptores, ambos envolvidos nos mecanismos parácrinos entre

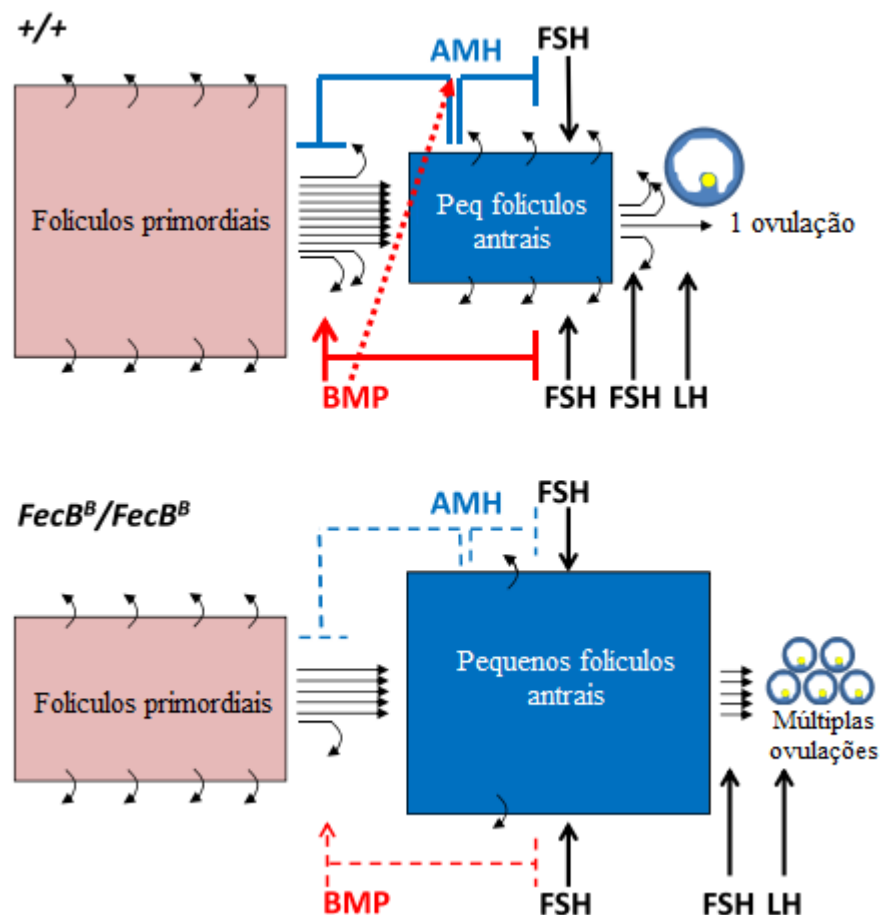
oócito e células da granulosa. Alterações nestes mecanismos acabam por influenciar a taxa de ovulação e, consequentemente, o número da prole (PRAMOD et al., 2013; MONNIAUX et al., 2016). Na figura 6 estão esquematizados os momentos em que se iniciam a expressão de alguns dos genes reguladores do desenvolvimento folicular e cuja ação pode estar associada às maiores taxas de ovulação.

Figura 5. Diferentes estágios do desenvolvimento folicular em ovelhas, com indicação do início de expressão de genes no (a) oócito, (b) células da granulosa e (c) células da teca interna. As setas verticais indicam tanto o momento de início de expressão como também a continuidade da expressão dos genes até o pico pré ovulatório de LH. Adaptado de Montgomery et al. (2001).



Em ovelhas, os genes mais estudados que regem o desenvolvimento folicular e oocitário são o BMPR-1B, BMP-15 e GDF9 (DAVIS 2005; PRAMOD et al., 2013). Apesar disso, os mecanismos pelos quais mutações no BMP-15 e GDF9 induzem múltiplas ovulações ainda não são completamente conhecidos (MONNIAUX, 2016). Já a mutação do tipo FecB^B (mutação Booroola) no gene BMPR-1B possui um consenso quanto ao seu mecanismo de ação, que é esquematizado na Figura 6.

Figura 6. Efeito da perda de função parcial causada pela mutação FecB^B (Booroola) no receptor para proteína morfogenética óssea do tipo 1B (BMPR 1B). A reserva de folículos primordiais é menor, ao nascimento, em borregas FecB^B/FecB^B do que em borregas sem a mutação (+/+). No entanto, a depleção desta população folicular é menor nas ovelhas com a mutação em função da menor taxa de ativação (flechas pretas horizontais) dos folículos primordiais. Ovelhas adultas FecB^B/FecB^B possuem mais folículos antrais saudáveis que maturam e são capazes de ovular com um menor diâmetro. Assim, a cada ciclo estral, múltiplas ovulações de oócitos competentes são desencadeadas simultaneamente pelo pico pré ovulatório de LH. A menor atividade das BMPs (em função da mutação nos receptores 1B) diminui a taxa de recrutamento e de atresia folicular (flecha preta em semicírculo) e acelera a diferenciação das células da granulosa (pelo aumento da sensibilidade destas ao FSH) (MONNIAUX, 2016). Em ovelhas FecB^B/FecB^B as BMPs não estimulam de forma eficiente a expressão e secreção de AMH nas células da granulosa (ESTIENNE et al., 2017), o que contribui para a sensibilização destas células ao FSH, aumenta o número de folículos competentes recrutados e acelera a diferenciação final, especialmente a formação de receptores de LH. Adaptado de Monniaux (2016).



Tem sido questionado se indivíduos que possuem mutações que aumentam a taxa de ovulação e prolificidade, não poderiam demonstrar uma resposta superior quando submetidos às biotécnicas de reprodução assistida (JUENGEL et al., 2011; LAHOZ et al., 2013). Cognié et al. (1998) verificaram que ovelhas com a mutação Booroola tiveram maior taxa de blastocisto, após a fertilização *in vitro*, do que ovelhas sem esta mutação. Taxas de ovulação superiores, após tratamentos superovulatórios, também foram encontradas em ovelhas com esta mutação (DUFOUR et al., 2000; MCNATTY et al., 2006). Lahoz et al. (2013), trabalhando com a produção *in vitro* de embriões, verificaram que ovelhas heterozigotas para o alelo FecX^R (BMP15) produziram um maior número de oócitos competentes para fertilização *in vitro* e maior sobrevivência embrionária após inovulação quando comparadas as ovelhas que não tinham o gene mutante. No entanto, Juengel et al. (2011) após imunizarem ovelhas contra a BMP 15, na tentativa de mimetizar a condição provocada pela mutação, não encontraram resultados satisfatórios ao submeter os animais imunizados à superestimulação gonadotrófica.

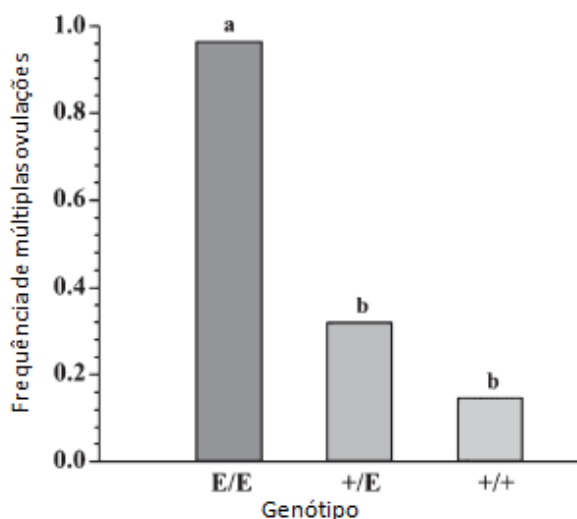
Especificamente em ovelhas da raça Santa Inês (SI), um novo polimorfismo (*FecG^E*) no gene GDF9 foi associado ao aumento da taxa de ovulação (Figura 7) (SILVA et al., 2011). Diferente de outras mutações reportadas, as ovelhas SI homozigotas para a mutação *FecG^E* foram as que manifestaram maior prolificidade (Quadro 3). Dada esta evidência junto aos relatos de superioridade de resposta, após a superovulação, de ovelhas com mutações para prolificidade, é possível questionar se ovelhas Santa Inês heterozigotas ou homozigotas para a mutação *FecG^E* teriam desempenho superior na produção *in vivo* de embriões. Esta linha de pensamento, poderia culminar com uma nova metodologia para a seleção de doadoras com maior potencial de resposta.

Quadro 3. Efeito dos diferentes genótipos da mutação *FecG^E* na prolificidade de ovelhas da raça Santa Inês

Genótipo	Prolificidade (n)
+/+	1,13 (219) ^a
+/E	1,44 (102) ^b
E/E	1,78 (13) ^c

Letras diferentes na mesma coluna diferem ($p < 0,001$). Homozigotas recessivas (+/+); heterozigotas (+/E) e homozigotas dominantes (E/E). Adaptado de Silva et al. (2011).

Figura 7. Frequência de múltiplas ovulações (≥ 2 CL) em função do genótipo (E/E homozigose n = 9; +/E heterozigose n = 15; +/+ sem o alelo n=15; para a mutação FecG^E) em ovelhas da raça Santa Inês. Grupos com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,001). Adaptado de Silva et al. (2011).



De forma geral, os estudos dos fatores genéticos que controlam a atividade ovariana têm contribuído para o entendimento do complexo mecanismo de recrutamento, diferenciação e ovulação em mamíferos (SILVA et al., 2011; COSTA et al., 2012; MONNIAUX, 2016). No entanto, a seleção de animais mais prolíficos para a formação de rebanhos comerciais deve ser criteriosamente avaliada. Isto porque partos gemelares podem estar associados à maior mortalidade e menores taxas de crescimento (FOGARTY, 2009).

2.3 Repetibilidade de resposta

Outro fator limitante em programas MOTE é a possibilidade de animais diminuírem a produção de embriões quando submetidos a sucessivos tratamentos (COGNÍÉ et al., 1999; BARI et al., 2001; BRUNO-GALARRAGA et al., 2014). No entanto, tem sido observado em bovinos e caprinos uma alta repetibilidade de resposta das doadoras. Ou seja, animais que respondem de forma satisfatória tendem a manter este padrão de resposta em protocolos consecutivos (MONNIAUX et al., 2010; MONNIAUX et al., 2011).

Apesar da aplicabilidade desta informação, pouco tem sido publicado sobre o tema na espécie ovina. Investigando a temática, Bari et al. (2001) encontraram níveis medianos de repetibilidade para resposta à superovulação e número de embriões recuperados ($r=0,55$; $r=0,38$ respectivamente) em ovelhas. De forma similar, Bruno-Galarraga, et al. (2014), trabalhando com ovelhas, encontraram alta repetibilidade para a taxa de ovulação, mas baixa repetibilidade para o número de embriões recuperados ($r=0,84$; $r=0,13$, respectivamente). Apesar dos bons índices de repetibilidade para a taxa de ovulação, o número de embriões viáveis recuperados por ovelha não tem se mantido constante e alguns estudos vêm apontando uma redução drástica nas superovulações consecutivas, como relatado por Forcada et al. (2011). Neste estudo, verificou-se cerca de 7,8, 3,8 e 2,5 embriões viáveis na primeira, segunda e terceira superovulação, respectivamente. Observando estes dados e considerando-se que um desempenho ruim em uma etapa da SOV não exclui a possibilidade de sucesso em outra, a seleção de doadoras baseada exclusivamente na sua resposta a uma superovulação não pode garantir maiores taxas de sucesso (BARI et al., 2001). Assim, mais estudos controlando fatores intrínsecos (idade, raça, peso, população folicular, status endócrino) e extrínsecos (época do ano, manejo do rebanho, protocolo superovulatório) que afetam a resposta superovulatória precisam ser conduzidos, para elucidar em que condições haverá repetibilidade de resposta a protocolos de superovulação.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Capítulo 1

- Ovelhas da raça Santa Inês com maior potencial para produção *in vivo* de embriões podem ser selecionadas por meio de uma pré-estimulação com eCG, pela contagem de folículos antrais, pela concentração do hormônio anti-Mülleriano e pela frequência de apresentação da mutação FecG^E.

Capítulo 2

- A ultrassonografia modo Doppler Colorido substitui a laparoscopia na avaliação da resposta superovulatória, pela contagem de corpos lúteos, em ovelhas da raça Santa Inês.

Capítulo 3

- Ovelhas da raça Santa Inês mantêm o padrão de resposta ovariana quando submetidas a sucessivas superovulações.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Aperfeiçoar a biotécnica de produção *in vivo* de embriões em ovinos elegendo um método para seleção de doadoras mais produtivas; diminuir o número de etapas cirúrgicas; e verificar a repetibilidade de resposta das doadoras de embrião.

4.2 Específicos

- Comparar quatro metodologias para a triagem de doadoras com maior potencial para a produção *in vivo* de embriões: resposta superovulatória ao eCG, concentração plasmática do hormônio anti-Mülleriano, contagem de folículos antrais, e genótipo para a mutação FecG^E;
- Validar o uso da ultrassonografia modo Doppler Colorido para a avaliação da resposta superovulatória em ovinos;
- Avaliar a repetibilidade de resposta da doadora a sucessivos protocolos superovulatórios.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa Pós-Graduação e Inovação da Universidade Federal Fluminense (processo 699; anexo 1). Durante a condução do experimento, foram seguidos os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

5.1 Período, animais, local do estudo e desenho experimental

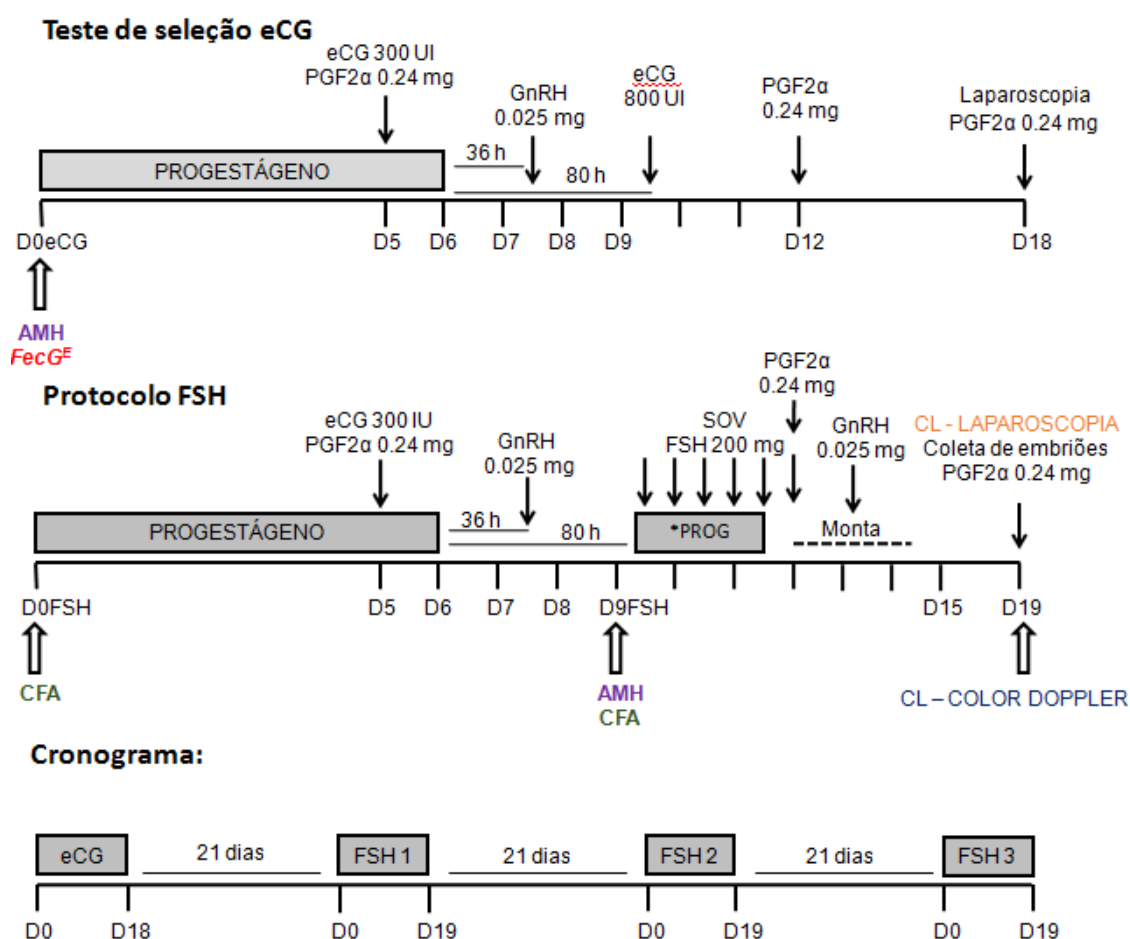
O estudo foi realizado durante os meses de janeiro a maio de 2016 na Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UniPECO) em Cachoeiras de Macacu (latitude 22°27'45"S, longitude 42°39'11"W e 57 m de altitude), Rio de Janeiro, Brasil.

Foram utilizadas 25 borregas da raça Santa Inês, com idade média de $11,9 \pm 1,1$ meses, peso vivo de $38,8 \pm 4,1$ kg, e escore de condição corporal de $2,8 \pm 0,3$ (em uma escala de 1 – muito magra até 5 - obesa; SUITER, 1994). Os animais foram previamente avaliados por meio de exame clínico e ultrassonografia do trato genital, nos quais não foram constados problemas clínicos ou reprodutivos. O sistema de criação era intensivo, em baias coletivas com piso ripado. Fornecia-se, três vezes ao dia, capim Napier picado (*Pennisetum purpureum*) e 200 g diárias de concentrado com 16% de proteína bruta (à base de milho, soja e núcleo mineral). Água e sal mineral (Salinas Ovinos, Salinas, Minas Gerais, Brasil) eram fornecidos *ad libitum*.

Um único bloco de atividades foi organizado para permitir a avaliação das hipóteses científicas com o menor uso possível dos animais. Assim, os animais foram inicialmente submetidos a um protocolo superovulatório à base de gonadotrofina coriônica equina (eCG). Vinte e um dias após o término do protocolo com eCG, os animais foram submetidos a três sessões para produção *in vivo* de embriões, utilizando-se sempre o mesmo protocolo à base de FSH e respeitando um intervalo de 21 dias entre os protocolos. Em momentos pré-determinados, durante o protocolo de eCG e o primeiro protocolo com FSH, foram coletadas amostras de sangue para genotipagem da mutação FecG^E e determinação da concentração plasmática do hormônio anti-Mülleriano.

Realizou-se ainda, a contagem de folículos antrais, a contagem de corpos lúteos por ultrassonografia modo Color Doppler, e a contagem de corpos lúteos por laparoscopia (Figura 8).

Figura 8. Desenho esquemático representando o teste de seleção com eCG, o protocolo com FSH para produção *in vivo* de embriões e o intervalo empregado entre os protocolos. São indicados ainda, os momentos de coleta de sangue para genotipagem, determinação do hormônio anti-Mülleriano, bem como os momentos da contagem de folículos antrais e da contagem do número de corpos lúteos (por ultrassonografia modo Doppler Colorido e laparoscopia). O intervalo utilizado entre os protocolos também é indicado.



5.2 Teste para seleção de doadoras com eCG

Os animais foram superovulados com eCG após um protocolo curto de sincronização do estro, seguindo o conceito do "Protocolo Dia 0" (MENCHACA et al., 2009), com adaptação para ovelhas Santa Inês (BALARO et al., 2016) (Figura 8). Resumidamente, uma esponja impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP; Progespon, Schering Plough, São Paulo, Brasil) foi mantida por seis dias. Um dia antes da remoção de esponja, foram administradas 300 UI de eCG (Novormon, Schering Plough, São Paulo, Brasil) e 0,24 mg de cloprostenol sódico (Estron, Tecnopec, São Paulo, Brasil) IM. Trinta e seis horas após a remoção de esponja aplicou-se 0,025 mg de acetato de gonadorelina (Gestran Plus, Tecnopec, São Paulo, Brasil) IM. Oitenta horas após a remoção da esponja, foram administradas 800 UI de eCG e, 60 horas após este, aplicou-se 0,24 mg de cloprostenol sódico. Oito dias após a dose superovulatória de eCG os animais foram submetidos a laparoscopia conforme descrito por Bruno-Galarraga et al. (2015) para a contagem de CL (CL_{LAP}). Com base no número de CL vascularizados contabilizados, os animais foram classificados como de alto (HR_{eCG} >3 CL) ou baixo (LR_{eCG} ≤ 3 CL) potencial de resposta, por metodologia previamente sugerida por Bruno-Galarraga et al. (2015). Imediatamente após a laparoscopia administrou-se 0,24 mg de cloprostenol sódico. Todo o eCG utilizado pertencia ao mesmo lote de fabricação.

5.3 Produção *in vivo* de embriões

Da mesma forma como descrito no item 5.2, previamente à superovulação, os animais foram submetidos a um protocolo curto para sincronização do estro (Figura 8). Assim, 80 horas após a remoção da esponja administrou-se 200 mg de FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá), em seis doses decrescentes a cada 12 horas (50/50, 30/30, 20/20 mg) IM. Imediatamente antes da primeira dose de FSH, uma nova esponja foi inserida e mantida até a quinta dose. Imediatamente após a última dose de FSH, administrou-se 0,24 mg de cloprostenol sódico e, 24 horas após este, 0,025 mg de acetato de gonadorelina IM. As ovelhas foram cobertas por quatro carneiros da raça Santa Inês previamente aprovados em exame andrológico. Iniciaram-se

as tentativas de cobertura (monta controlada) após a última dose de FSH e então, a cada 12 horas, até a não aceitação de monta pela fêmea.

Oito dias após a retirada da segunda esponja, os embriões foram recuperados por via cirúrgica. Para isso, os animais eram mantidos em jejum alimentar de 36 horas e hídrico de 24 horas. Sedados com acepromazina IV (0,1 mg/kg, Acepran 1%, Vetnil, São Paulo, Brasil), diazepam IV (0,3 mg/kg, Uni-Diazepax, União Química, São Paulo, Brasil) e morfina IM (0,4 mg/kg, Dimorf, São Paulo, Brasil). A indução anestésica era realizada utilizando-se cloridrato de cetamina IV (6 mg/kg Cetamin, Syntec, São Paulo, Brasil) e propofol IV (1 mg/kg, Provive, Claris, São Paulo, Brasil). A anestesia era então mantida utilizando-se isoflurano (Isoforine, São Paulo, Brasil).

Para coleta dos embriões, as fêmeas eram mantidas em decúbito dorsal sobre uma maca em calha. Por meio de uma incisão sobre a linha alba, a aproximadamente 10 cm cranial ao úbere, o corpo do útero e cornos uterinos eram expostos. Com o auxílio de uma ponteira para micropipeta (0-10µL) realizava-se uma perfuração na porção média do corno uterino. Por esta perfuração inseria-se uma sonda uretral (06) que era então direcionada até o ápice do corno uterino, o mais próximo possível da junção útero-tubárica. Uma segunda perfuração era realizada na base do corno uterino e através desta inseria-se uma sonda com balonete (Sonda p/ TE de silicone 8FR – 2-3cc – 33 cm, Biodux, São Paulo, Brasil). Pela sonda uretral injetava-se 40 mL de DMPBS (Solução Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco, Biodux, São Paulo, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Nutricell, São Paulo, Brasil). O DMPBS era então recuperado pela sonda de silicone situada na base do corno uterino, acondicionado em tubos tipo Falcon de 50 mL e então encaminhado para o rastreamento. Os embriões eram morfológicamente avaliados sob um estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão) utilizando uma ampliação de 20 até 40 vezes. Repetia-se o mesmo procedimento para o corno uterino contralateral. Durante todo o procedimento a parte exposta do aparelho reprodutor era constantemente irrigada com solução fisiológica heparinizada (5 UI/mL) (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) e preaquecida a 37 °C. Após a lavagem dos dois cornos uterinos, estes recebiam uma camada de gel de heparina (Trombofobe Gel, Abbott, Rio de Janeiro, Brasil), eram recolocados na cavidade abdominal e esta era instilada com 500 mL de solução fisiológica

heparinizada (5 UI/mL), acrescida de 12,5 mg de dexametasona (Dexacort, Marcolab, Rio de Janeiro, Brasil) também preaquecida a 37 °C. A cavidade era fechada com duas linhas de sutura: sendo as camadas musculares suturadas em padrão Sultan, com fio absorvível (Poliglicólico 0, Shalon, Goiás, Brasil) e as bordas da pele justapostas em padrão simples interrompido com fio inabsorvível (Nylon 0, Shalon, Goiás, Brasil). A ferida cirúrgica era limpa diariamente com solução de iodo a 1% (Riodeine, Rioquímica, São Paulo, Brasil), recebia uma camada de pomada cicatrizante (Unguento Vansil, Vansil, São Paulo, Brasil) e era circundada com antisséptico e repelente em aerossol (Aerocid spray, Agener União, São Paulo Brasil).

5.4 Avaliações ultrassonográficas

Para as avaliações ultrassonográficas (Sonoscape S6, SonoScape, Shenzhen, China), as ovelhas eram mantidas em estação, contidas por um tronco para contenção de pequenos ruminantes em uma sala com controle de luminosidade. Para as avaliações, utilizou-se um transdutor linear de 7,5 MHz acoplado a um suporte de plástico para permitir a inserção e manipulação transretal. Após a inserção do transdutor, cada ovário foi localizado e inteiramente escaneado de forma lenta e contínua em modo B. A imagem era então congelada e, utilizando a função *cineloop*, podia ser observado quadro a quadro, permitindo assim a contagem dos folículos antrais (CFA). As CFA foram realizadas em dois momentos: no início do protocolo para produção *in vivo* de embriões (D0_{FSH}) e no momento da aplicação da primeira dose de FSH (D9_{FSH}). Os valores de corte da CFA utilizados para classificar ovelhas como de alto ou baixo potencial de resposta, foram determinados por análise da curva ROC. Animais com <10 folículos foram classificados como sendo de baixo potencial de resposta nos dois momentos avaliados (LR_{AFC_D0FSH} e LR_{AFC_D9FSH}). Já ovelhas com ≥10 folículos nos momentos D0_{FSH} e D9_{FSH} foram classificadas como sendo de alto potencial de resposta (HR_{AFC_D0FSH} e HR_{AFC_D9FSH}).

A contagem de CL e a avaliação da intensidade de vascularização eram realizadas 12 horas antes da laparoscopia nos protocolos para produção *in vivo* de embriões. Para avaliar a vascularização das estruturas ovarianas, após a localização dos ovários em modo B, a função Doppler Colorido era acionada e

iniciava-se então a varredura completa do ovário. A imagem era então congelada e, utilizando a função cineloop, era realizada a quantificação de CL (CL_{DOPPLER}) e a determinação subjetiva da intensidade de vascularização do CL. Para a avaliação da intensidade de vascularização, aplicou-se uma escala de 1 a 4. Esta escala permitia uma estimativa visual da porcentagem de área do CL com vascularização, sendo: 1 – baixa (0-25%); 2 – média (26-50%); 3 – alta (51-75%) e 4 muito alta (76-100%). Somente CL com vascularização escore 2 ou superior foram considerados funcionais e contabilizados. Para as avaliações de vascularização, a configuração utilizada para o modo Doppler Colorido foi: ganho de cor de 20%, frequência de repetição de pulso (PRF) de 1,0 KHz, 7 cm de profundidade e filtro de parede (WF) de 75 KHz. Todas as avaliações ultrassonográficas (Figura 8) foram realizadas pelo mesmo operador.

5.5 Dosagem de AMH

As coletas de sangue para avaliação da concentração de AMH foram realizadas em dois momentos (Figura 8). O primeiro, imediatamente antes da inserção da esponja no protocolo com eCG – isto é, animais em uma fase aleatória do ciclo estral (D0_{eCG}). O segundo, imediatamente antes da primeira dose de FSH, no protocolo FSH – isto é, animais com o ciclo estral sincronizado (D9_{FSH}) –. O sangue foi coletado puncionando a veia jugular, utilizando tubos de vácuo contendo EDTA (Vacutainer, BD, Juiz de Fora, Brasil). As amostras eram imediatamente centrifugadas a 1500 x *g* durante 10 minutos e o plasma removido e armazenado a -20 °C. As amostras foram encaminhadas para um laboratório particular (LEAC, São Paulo, Brasil) e as concentrações plasmáticas de AMH foram medidas por meio de um *Kit* comercial ELISA (Equine and Ovine AMH ELISA, AnshLabs, Texas, EUA). As amostras foram avaliadas em uniplicata, em um único ensaio. A curva de calibração foi configurada com 5100 pg/mL para o ponto máximo e 20 pg/mL para o ponto mínimo. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente (23 °C), homogeneizadas e centrifugadas (3200 x *g* por 10 minutos). Em seguida, adicionou-se o anticorpo primário e as amostras foram incubadas durante a noite a 4 °C. Após a adição do anticorpo secundário, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 90 minutos. Estes períodos de incubação foram adotados para melhorar

a sensibilidade do ensaio (RICO et al., 2012). A sensibilidade do ensaio foi de 9 pg/mL e os coeficientes de variação intra-ensaio ($SD / média \times 100$) ficaram entre 3% e 7%. Adicionalmente, para controle de qualidade, foram incluídas amostras com concentrações conhecidas de AMH. Todos os dados encontrados estavam dentro dos pontos mínimo e máximo da curva.

Os valores de corte do AMH para classificar ovelhas como de alto ou baixo potencial de resposta, foram determinados por análise da curva ROC. No momento D0_{eCG}, ovelhas com níveis plasmáticos de AMH <177 pg/mL foram classificadas como de baixo potencial de resposta (LR_{AMH_D0eCG}) e ovelhas com níveis plasmáticos de AMH ≥177 pg/mL foram classificadas como de alto potencial de resposta (HR_{AMH_D0eCG}). No momento D9_{FSH}, as ovelhas com <168 pg/mL de AMH foram classificadas como de baixo potencial de resposta (LR_{AMH_D9FSH}) e ovelhas com AMH ≥168 pg/mL foram classificadas como de alto potencial de resposta (HR_{AMH_D9FSH}).

5.6 Genotipagem para mutação FecG^E

As amostras de papa de leucócitos para genotipagem foram coletadas imediatamente antes do início do protocolo eCG (D0_{eCG}) (Figura 8). O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue usando o método *salting-out* (BIASE et al., 2002). Foi realizada uma PCR-RFLP para identificação da mutação FecG^E, amplificando a região peptídica madura GDF9 com os seguintes iniciadores (forward 5'-GACCAGGAGAGTGTCAGC, 5'-CGACAGGTACACTTAGT reverse). As reações de PCR foram completadas em 20 µL, com 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 400 µM de solução dNTP, 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 100 ng de DNA genômico. O PCR foi conduzido de acordo com os seguintes ciclos: 93 °C/3 min; 35 ciclos de 93 °C/40 s, 56 °C/40 s, 72 °C/40 s, e uma extensão final de 72 °C/5 min. Seguindo-se, 2 µL da reação de PCR foram digeridos durante a noite com TspRI (Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA foram diferenciados dentro de um gel de agarose a 2,5%, e a genotipagem foi conduzida de acordo com o tamanho dos produtos de DNA digeridos. Considerando que a mutação FecG^E tem um efeito aditivo (SILVA et al., 2011), foi hipotetizado que ovelhas sem esta mutação (tipo

selvagem: +/+) seriam de baixo potencial de resposta (LR_{+/+}) e ovelhas heterozigotas (+/E) seriam de alto potencial de resposta (HR_{+/E}).

5.7 Análise Estatística

5.7.1 Análise estatística do Capítulo 1

Para a avaliação dos dados referentes à seleção de doadoras, foi utilizado o software estatístico SAEG (SAEG 9.0, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Lilliefors. Os dados paramétricos foram analisados usando um procedimento de modelo misto, seguido do teste Tukey, ou teste LSD de Fisher, para comparação de médias, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre a contagem de CL após o protocolo FSH e a contagem de CL após o protocolo eCG, e também as correlações entre a concentração de AMH e a CFA. Para todos os testes, $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

Os dados foram submetidos à análise ROC, para determinar os pontos de corte de AMH e CFA para seleção de ovelhas com maior potencial de resposta para a produção *in vivo* de embriões (GREINER et al., 2000; RICO et al., 2012). Utilizando como padrão-ouro para seleção de doadoras com alto potencial de resposta, ovelhas >7 CL (protocolo FSH), cada um dos valores obtidos de AMH, CFA e contagem de CL (no protocolo eCG) foi utilizado como ponto de corte para identificar animais como de alto ou baixo potencial de resposta ao protocolo FSH. A comparação entre o resultado dicotômico e a real classificação do indivíduo (dada pelo número de CL apresentados após o protocolo FSH) permitiu estimar a especificidade (Sp = probabilidade de alta resposta [>7 CL] em um indivíduo classificado como de alto potencial de resposta) e sensibilidade (Se = probabilidade de baixa resposta [$\leq 7CL$] em um indivíduo classificado como de baixo potencial de resposta). O desempenho diagnóstico, em termos de Se e $(1 - Sp)$, foi avaliado para cada possível ponto de corte para AMH e CFA usando a análise ROC. Os pares resultantes ($(1 - Sp)$ e Se) foram plotados no plano ROC unitário. Em seguida, a área sob a curva ROC resultante (AUC) foi estimada usando uma abordagem não paramétrica (método Wilcoxon para estimativa de

área) e comparada com o valor esperado ($AUC = 0,5$) sob a hipótese nula de um teste não informativo, por meio do teste Mann-Whitney (GREINER et al., 2000). Quando a AUC foi significativamente diferente de 0,5; foi selecionado o ponto de corte que maximizava o índice de Youden ($J = Se + Sp - 1$), que corresponde ao ponto mais alto e a esquerda do plano ROC. O valor preditivo positivo (PPV, expresso em %) foi definido como a probabilidade de se obter >7 CL após protocolo FSH, se os valores de AMH, CFA e número de CL (no protocolo eCG) estivessem acima do ponto de corte ou no ponto de corte para a mutação $FecG^E$. O valor preditivo negativo (NPV, expresso em %) foi definido como a probabilidade de se obter ≤ 7 CL após o protocolo FSH, se os valores de AMH, CFA e número de CL no protocolo eCG estivessem abaixo do ponto de corte ou no ponto de corte para a mutação $FecG^E$. A acurácia foi definida como a proporção de respostas corretas com o ponto de corte estipulado. Finalmente, o coeficiente kappa foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre o ponto de corte estipulado e a contagem de CL após o protocolo FSH.

5.7.2 Análise estatística do Capítulo 2

Os dados foram analisados usando o software SPSS (Pacote Estatístico para Ciências Sociais - Inc.) sempre considerando 5% de significância. As variáveis $CL_{DOPPLER}$ e CL_{LAP} foram expressas como média e desvio padrão e testadas quanto a normalidade e homocedasticidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Estas variáveis foram comparadas entre si pelo teste de t Student emparelhado. A correlação entre as variáveis foi determinada pelo método de correlação de Pearson, análise de regressão linear simples e coeficiente de correlação intraclass (ICC). Considerando a técnica de contagem CL_{LAP} como o método padrão-ouro, o desempenho da técnica de contagem $CL_{DOPPLER}$ para determinar o número de CL foi avaliado calculando os valores de sensibilidade (SENS), especificidade (SPEC), valor preditivo positivo (PPV) e valor preditivo negativo (NPV). As avaliações foram realizadas em diferentes pontos de corte (1 a 9) considerando o número de CL por ovário. Estes parâmetros de desempenho foram calculados da seguinte forma: $SENS = TP / (TP + FN)$; $SPEC = TN / (TN + FP)$; $PPV = TP / (TP + FP)$; $NPV = TN / (TN + FN)$ (TP - verdadeiros positivos; FN - falsos negativos; TN - verdadeiros negativos;

FP - falsos positivos). Determinou-se ainda o coeficiente kappa e a área sob a curva ROC.

5.7.3 Análise estatística do Capítulo 3

Foi utilizado o programa SAEG 9.0 (Sistema para Análise Estatística, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) para a análise dos resultados. Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Lillefors. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas e a comparação de médias foi avaliada pelo teste LSD de Fisher. O teste Exato de Fisher ou o teste Qui quadrado foram utilizados para avaliar se houve diferença estatística entre a frequência de ovelhas em estro, superovuladas e que apresentaram cisto ovariano entre as repetições realizadas. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A análise estatística das taxas (%) de recuperação, viabilidade, fertilização e degeneração foi realizada após transformação arco-seno da raiz quadrada das porcentagens. A repetibilidade de resposta entre as sucessivas superovulações foi avaliada por meio da correlação de Pearson, regressão linear simples e coeficiente de correlação intra-classe (ICC). Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

6. CAPÍTULO 1

Anti-Müllerian Hormone and Antral Follicle Count are More Effective for Selecting Ewes With Good Potential for In Vivo Embryo Production Than the Presence Of *FecG^E* Mutation Or eCG Pre-Selection Tests

*O hormônio anti-Mülleriano e a contagem de folículos antrais são mais
eficientes para selecionar ovelhas com bom potencial para produção “in vivo”
de embriões do que a presença da mutação *FecG^E* e que o eCG-teste*

Artigo publicado no periódico: Theriogenology

Aceito em: fevereiro de 2018 **DOI:**10.1016/j.theriogenology.2018.02.018

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

Anti-Müllerian Hormone and Antral Follicle Count are More Effective for Selecting Ewes With Good Potential for In Vivo Embryo Production Than the Presence Of *FecG^E* Mutation Or eCG Pre-Selection Tests

Pedro Henrique Nicolau Pinto^{a,*}; Mario Felipe Alvarez Balaro^a; Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan^a; Lilian dos Santos Ribeiro^a; Gláucia Mota Bragança^a; Ceci Ribeiro Leite^a; Eduardo Kenji Nunes Arashiro^a; Kleibe de Moraes Silva^b, Jeferson Ferreira Da Fonseca^c; Felipe Zandonadi Brandão^a

^aFaculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, CEP 24230-340, Niterói, RJ, Brazil.

^bEmbrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, CEP 62010-970, Sobral, CE, Brazil.

^cEmbrapa Caprinos e Ovinos, Núcleo Regional Sudeste, Rodovia MG 133 Km 42, CEP 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brazil.

**Corresponding author Email: pedropintoufpr@gmail.com*

Abstract

This study aims to compare four different methods for selecting high responding sheep donors for in vivo embryo production. These methods include a pre-selection eCG test (eCG), antral follicle count (AFC), plasma anti-Müllerian hormone measurement (AMH) and genotyping for the presence of the *FecG^E* mutation (a polymorphism in the *GDF9* gene associated with increased ovulation rate). Santa Ines ewe lambs (n = 25) underwent superovulation (SOV) with 800 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) and the corpus luteum (CL) count was recorded by laparoscopy after eight days. At the D0_{eCG}, blood samples for AMH and genotyping analysis were collected. Twenty-one days after the end of the eCG test, the same animals underwent SOV with 200 mg of FSH, administered in six decreasing doses, and then naturally mated. Immediately before the beginning of the FSH protocol (D0_{FSH}), and at the moment of the first FSH dose (D9_{FSH}), the AFC was assessed. Plasma AMH was again determined at the D9_{FSH}. After each screening process, animals were classified as having a high (HR), or low (LR), potential of response (using specific thresholds for each method). Then, the ewes' response to SOV and embryo yield for each screening method, classified as HR or LR, were compared. Animals classified as HR by AFC (HR_{AFC}) and by AMH concentration (HR_{AMH}) at the D9_{FSH}, produced more viable embryos than those classified as LR_{AFC} and LR_{AMH} (HR_{AFC} 6.2 ± 3.2 vs LR_{AFC} 2.8 ± 3.0 and HR_{AMH} 6.6 ± 3.6 vs LR_{AMH} 3.0 ± 2.9). Pre-selection tests with eCG and different *FecG^E* genotypes, either heterozygous (+/E) or wild type (+/+), were unable to discriminate HR or LR animals. A tendency (P = 0.06) to have lower plasma AMH was observed in heterozygous *FecG^E* (+/E) ewes. In conclusion, both AFC and plasma AMH can

be used to select donor ewes with a higher potential of response for in vivo embryo production.

Key words: sheep, superovulation, donor selection, MOET.

1. Introduction

In sheep embryo production programs, the variability of response after superovulation (SOV) is the most critical consideration [1]. In an attempt to overcome this issue, different methods have been proposed for screening the potential of the ewes' response to SOV. Recently, a pre-selection test based on a single high dose of equine chorionic gonadotropin (eCG), was suggested [2]. Since eCG is cheaper than FSH, this test consists of inducing SOV with a single dose of eCG, and the animals are classified as low or high responders, based on their corpus luteum (CL) count. Significant correlations between ovulation rates after eCG tests and subsequent FSH treatment were reported for Merino ewes and goats (Saanen does) [2,3]. In goats, the antral follicle count (AFC) was highly correlated with CL count and transferable embryos after SOV [3,4]. Therefore, AFC was considered a feasible tool for selecting goats with a greater likelihood of producing higher CL and embryo count after SOV. It is important to highlight that AFC can be easily and readily assessed through ultrasonography. However, in sheep, the association between AFC and the quality of response after SOV is not well-established and contradictory results have been reported [2,5,6].

In recent years, the assessment of plasma anti-Müllerian hormone (AMH) concentration has been proposed as a methodology for selecting better embryo donors in cattle and goats. In these species, higher AMH levels are associated

with better performance in SOV and greater potential for embryo production [4,7,8]. In sheep, the AMH concentration at the beginning of the SOV treatment is highly correlated with the number of punctured follicles at laparoscopic ovum collection [9]. This evidence strongly suggest that AMH may also be used to select sheep with a higher potential for in vivo embryo production.

A series of mutations, mainly in the bone morphogenetic protein receptor 1B (*BMPR1B*), bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*), and growth and differentiation factor 9 (*GDF9*) genes, have been reported to induce higher prolific rates in sheep [10]. Animals with mutations that affect prolificacy can show a superior response to SOV [11, 12]. In Santa Ines ewes a mutation in the *GDF9* gene was found to affect the prolificacy and named *FecG^E* [13]. Ewes homozygous for the *FecG^E* mutation (E/E) showed an increased ovulation rate and twinning frequency. Data from the same study indicated an additive effect from the *FecG^E* allele, with a tendency for heterozygous ewes (+/E) to present more twinning births than wild type (+/+), but less than E/E animals. Therefore, we hypothesized that Santa Ines ewes carrying the *FecG^E* mutation could have a higher potential of response to SOV.

Despite these good prospects, the best practice for embryo donor selection is not well established. Thus, the present study aimed to assess the efficiency of different methods as a predictor of SOV response in ewes. These methods include the pre-selection eCG test, the AFC, the plasma AMH concentration, and the presence of the *FecG^E* mutation.

2. Material and methods

This research was approved by the Ethical Committee for Animal Use of the Universidade Federal Fluminense (protocol 699/15), and conducted under the ethical principles of the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

2.1 *Experimental location, animals and study design*

This study was performed during the breeding season, at Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UniPECO) in Cachoeiras de Macacu (22°27'45" S latitude), Rio de Janeiro, Brazil. Twenty-five nulliparous Santa Ines ewe lambs were used, with an average age of 11.9 ± 1.1 months, a live weight of 38.8 ± 4.1 kg, and body condition score of 2.8 ± 0.3 (on a scale of 1 being emaciated, and 5 obese). Animals did not show any reproductive problems by clinical or ultrasonographic examination. Animals were housed in a confined area, and fed chopped Napier grass (*Pennisetum purpureum*) and a concentrate for their maintenance. Water and mineral salt (Salinas Ovinos, Salinas, Minas Gerais, Brazil) were provided ad libitum.

Initially, all animals were submitted to an eCG pre-selection test without being mated or inseminated. Twenty-one days later, an in vivo embryo production protocol was performed, with an FSH-based protocol. Ewes underwent antral follicle counting and evaluation of the AMH at two time points. Moreover, *FecGE* genotyping was performed.

2.2 *Pre-selection test with eCG*

Animals underwent SOV after a short-wave synchronization protocol according to the "Day 0 protocol concept" [14], adapted for Santa Ines sheep

[15]. In brief, a sponge, impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MPA; Progespon, Schering Plough, São Paulo, Brazil), was inserted for six days. One day before sponge removal, 300 IU of eCG (Novormon, Schering Plough, São Paulo, Brazil) and 0.24 mg of cloprostenol sodium (Estron, Tecnopec, São Paulo, Brazil) were administered. Thirty-six hours after sponge removal, 0.025 mg of lecorelin (Gestran Plus, Tecnopec, São Paulo, Brazil) was administered. Eighty hours after sponge removal, 800 IU of eCG was administered and 60 hours later, 0.24 mg of cloprostenol sodium was administered. Eight days after the eCG treatment, the CL count was assessed by laparoscopy, as previously described [2]. Based on the CL count, ewes were classified as having a high potential of response ($HR_{eCG} > 3 \text{ CL}$) or low potential of response ($LR_{eCG} \leq 3 \text{ CL}$), as previously suggested [2]. Immediately after laparoscopy, 0.24 mg of cloprostenol sodium was administered to induce CL regression (Figure 1). All eCG used came from the same batch.

2.3 Counting the number of the follicles applied during the in vivo embryo production protocol

A short-wave synchronization protocol was performed, as described in the previous section. The SOV began 80 hours after sponge removal, using 200 mg of FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), administered in six decreasing doses, every 12 hours (50/50, 30/30, 20/20 mg). At the time of the first FSH dose, a new sponge was inserted and not removed until the fifth dose. Together with the last FSH dose, 0.24 mg of cloprostenol sodium was administered, and 24 hours later, 0.025 mg of lecorelin was administered. Ewes were mated with fertile Santa Ines rams every 12 hours,

between the last FSH dose and the end of the estrous behavior (Figure 1). Six to seven days after the last mating, embryos were surgically recovered, as previously described [16], and the total number of recovered structures (including unfertilized oocytes, degenerated embryos, and viable embryos), the number of viable embryos, as well as the number of CL were recorded.

Ovaries of all ewes were scanned by the same operator using a portable transrectal B-mode ultrasonography equipment (Sonoscape S6, SonoScape, Shenzhen, China), with a 7.5 MHz linear transducer attached to a plastic support. Each ovary was located and fully scanned in a slow, continuous movement. Thereafter, using the cineloop function, all visible follicles (1 to 6 mm) were counted. Follicle counts were performed at two time points: D0_{FSH} (immediately before insertion of the first sponge) and at D9_{FSH} (immediately before the first FSH dose). Animals with < 10 follicles were classified as having a low potential of response at both time points evaluated (LR_{AFC_D0FSH} and LR_{AFC_D9FSH}). Ewes with ≥ 10 follicles at D0_{FSH} and at D9_{FSH} were classified as having a high potential of response (HR_{AFC_D0FSH} and HR_{AFC_D9FSH}). The threshold values for AFC were determined using receiver-operating characteristic (ROC) analysis.

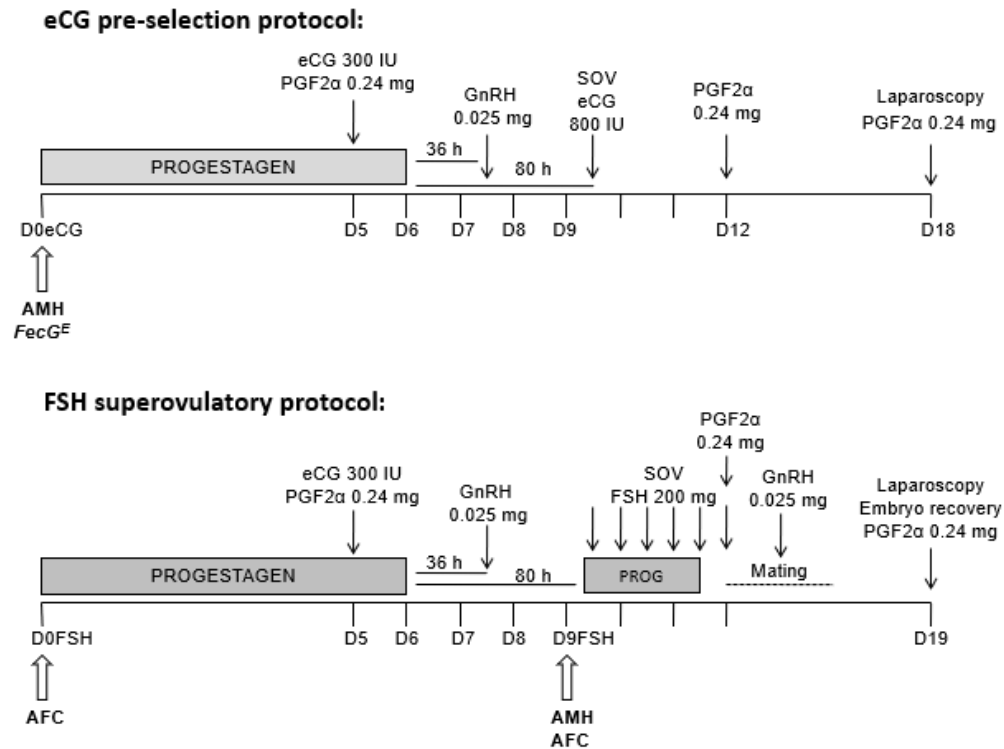


Figure 1. Schematic representation of the eCG pre-selection test, FSH superovulation protocol, blood collections for AMH assessment, antral follicle count (AFC), and embryo recovery. A 21-day interval was applied between the end of the eCG test (D18_{eCG}) and the beginning of the FSH superovulation protocol (D0_{FSH}).

2.4 AMH assay

Two blood samples were collected for assessment of AMH. The first was collected immediately before the sponge insertion in the eCG trial protocol—that is, with animals at a random phase of the estrus cycle— (D0_{eCG}). The second was collected immediately before the first FSH dose, in the FSH SOV protocol—that is, with animals in a synchronized phase of the estrus cycle— (D9_{FSH}). Blood was collected by jugular venipuncture, using vacuum tubes

containing EDTA (Vacutainer, BD, Juiz de Fora, Brazil). Samples were immediately centrifuged at 1500g for 10 minutes, and plasma was removed and stored at – 20°C until assay. Plasma AMH concentrations were measured by ELISA commercial KIT (Equine and Ovine AMH ELISA, AnshLabs, Texas, USA). Samples were evaluated as single samples, in a single assay. A calibration curve set was prepared with 5100 pg/mL for the maximum point and 20 pg/mL for the minimum. Samples were thawed at room temperature (23°C), vortexed and centrifuged (3200g for 10 minutes). Then primary antibody was added, and samples were incubated overnight at 4°C. After the secondary antibody addition, samples were incubated at room temperature for 90 minutes. These incubation periods were adopted to improve the sensitivity of the assay [17]. Test sensitivity was 9 pg/mL and intra-assay coefficients of variation $((SD/mean) \times 100)$ were between 3% and 7%. Quality control was also considered, by including samples with known AMH concentrations. All data were found to be within the minimum and maximum points of the curve.

The threshold values for AMH were determined by ROC analysis. At D0_{eCG}, ewes with plasma levels of AMH < 177 pg/mL were classified as having a low potential of response (LR_{AMH_D0eCG}), and ewes with plasma levels of AMH ≥ 177 pg/mL were classified as having a high potential of response (HR_{AMH_D0eCG}). At D9_{FSH}, ewes with < 168 pg/mL of AMH were classified as having a low potential of response (LR_{AMH_D9FSH}), and ewes with plasma AMH ≥ 168 pg/mL as having a high potential of response (HR_{AMH_D9FSH}).

2.5 *FecG^F* genotyping

Genomic DNA was extracted from blood leukocytes using the salting-out method [18]. A *FecG^E* PCR-RFLP was carried out, amplifying the *GDF9* mature peptide region with the following primers (forward 5'-GACCAGGAGAGTGTTCAGC; reverse 5'-CGACAGGTACACTTAGT). The PCR reactions were completed in 20 µl, with 0.5µM of each primer, 1.5mM MgCl₂, 400µM dNTP mix, 1.5 U Taq polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 100 ng of genomic DNA. The PCR was conducted according to the following cycles: 93°C/3 min; 35 cycles of 93°C/40 s, 56°C/40 s, 72°C/40 s, and a final extension of 72°C/5 min. Following this, 2 µL of the PCR reaction was digested overnight with TspRI (Biolabs, Massachusetts, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. DNA fragments were differentiated within a 2.5% agarose gel, and genotyping was conducted according to the size of the digested DNA products. Considering that the *FecG^E* mutation has an additive effect [13], we hypothesized that ewes without this mutation (wild type: +/+) would be of low potential of response (LR_{+/+}) and the heterozygous ones (+/E) of high potential of response (HR_{+/E}).

2.6 Statistical analysis

Data analysis was completed using SAEG statistical software (SAEG 9.0, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil). The Lilliefors test was used to verify data normality. Parametric data were analyzed using a mixed model procedure, followed by Tukey's test, or Newman–Keuls multiple-comparison tests, for contrasting two or several means, respectively. The Pearson's correlation coefficient was used to assess correlations between the CL count after the FSH protocol and the CL count after the eCG protocol, AMH

concentration and AFC. For all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

As described in previous reports [17,19], data were subjected to ROC analysis, in order to determine AMH and AFC threshold values for selecting ewes with a higher response to superovulation treatment. In accordance with the gold standard for higher responders (ewes with CL > 7), each of their values for AMH, AFC and CL count (eCG protocol) were recorded, and used as a benchmark for positive (high response) and negative (low response) test outcomes in the FSH treatment. A comparison between the dichotomized test results and true individual status (as determined by their CL counts after the FSH protocol) allowed for an estimation of the diagnostic specificity (Sp = probability of a positive test outcome in a high-responding individual) and sensitivity (Se = probability of a negative test outcome in a low-responding individual). The diagnostic performance, in terms of Se (and $1 - Sp$), were assessed for each possible AMH or AFC threshold value, using ROC analysis. The resulting pairs ($(1-Sp)$, Se) were plotted on a unit square. Then, the area under the resulting ROC curve (AUC) was estimated using a non-parametric approach (Wilcoxon-area estimate) and compared with the expected value ($AUC = 0.5$) under the null hypothesis of a non-informative test, using the two sample Mann–Whitney rank-sum test [19]. When the AUC was significantly different from 0.5, the AMH or AFC threshold value was chosen, to maximize the Youden index ($J = Se + Sp - 1$), which corresponds to the point of the ROC curve closest to the upper left-hand corner of the unit square. The positive predictive value (PPV; denoted as %) was defined as the probability of a CL count after FSH protocol of > 7 if the CL count at eCG protocol, AFC and AMH

were above the threshold, and at the threshold for the *FecGE* mutation. The negative predictive value (NPV; denoted as %) was defined as the probability of the CL count after FSH protocol being ≤ 7 if the CL count after eCG protocol, AFC and AMH were below the threshold, and at the threshold for the *FecGE* mutation. Accuracy was defined as the proportion of agreement (correct answers) within the stipulated threshold. Finally, the kappa coefficient was used to assess the degree of agreement between the threshold set, and the CL count after the FSH protocol.

3. Results

3.1 Pre-selection eCG test

No significant correlations were found between the CL count after eCG treatment and the CL count, total number of recovered structures, or number of viable embryos after FSH protocol ($r = -0.13; -0.09; -0.08$, $P > 0.05$ respectively).

3.2 Number of antral follicles

Weak to moderately-positive correlations were found between AFC at D0_{FSH} (first day of the FSH protocol, immediately before the first sponge insertion) and the CL count, total number of recovered structures and number of viable embryos after the FSH treatment ($r = 0.45; 0.56$ and 0.57 , respectively, $P < 0.05$). Also, weak to moderately-positive correlations were found between AFC at D9_{FSH} (the first FSH dose, follicular wave emergence) and the CL count, total number of recovered structures and number of viable embryos after the FSH treatment ($r = 0.41; 0.39$ and 0.42 , respectively, $P < 0.05$).

Between the two time points (D0_{FSH} and D9_{FSH}) at which AFC was determined, optimum diagnostic performance was observed at D9_{FSH} (Table 1). Therefore, only results relating to AFC at D9_{FSH} are shown (Figure 2). In order to determine the AFC threshold values for selecting ewes with a high CL response (> 7) to FSH treatment, AFC at D9_{FSH} data were evaluated (Figure 2). For each AFC taken as a possible threshold value, diagnostic sensitivity and specificity were determined (Figure 2A). The area under the ROC curve was significantly different from the area corresponding to the null hypothesis of a non-informative test ($P < 0.001$, Figure 2B). The AFC at D9_{FSH} which was found to maximize the Youden index was 10 follicles, corresponding to high PPV and NPV values.

Table 1. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively); accuracy and Kappa coefficient of different methods to select ewes with a high response to superovulation

	CL eCG	AFC		AMH		FecG^E
	> 3 CL	≥ 10 D0 _{FSH}	≥ 10 D9 _{FSH}	≥ 177 pg/mL D0 _{eCG}	≥ 168 pg/mL D9 _{FSH}	+/-E
Sensitivity (%)	41.7	56	89	70	86	75
Specificity (%)	53.9	86	75	40	67	30.7
PPV (%)	45.5	91	67	82	50	50
NPV (%)	50.0	43	92	25	92	75
Accuracy (%)	48.0	64	80	64	72	44
Kappa	0.04	0.32	0.6	0.08	0.43	0.03

CL eCG, CL count at eCG pre-selection test; AFC, antral follicle count; AMH, plasma anti-Müllerian hormone; +/-E, presence of one allele of the FecG^E mutation. Thresholds used are indicated under each test abbreviation. D0_{FSH} – first day of the protocol, just before sponge insertion; D9_{FSH} – point of first FSH

dose at superovulation; D0_{eCG} – immediately before the beginning of the eCG pre-selection test, before any hormonal intervention.

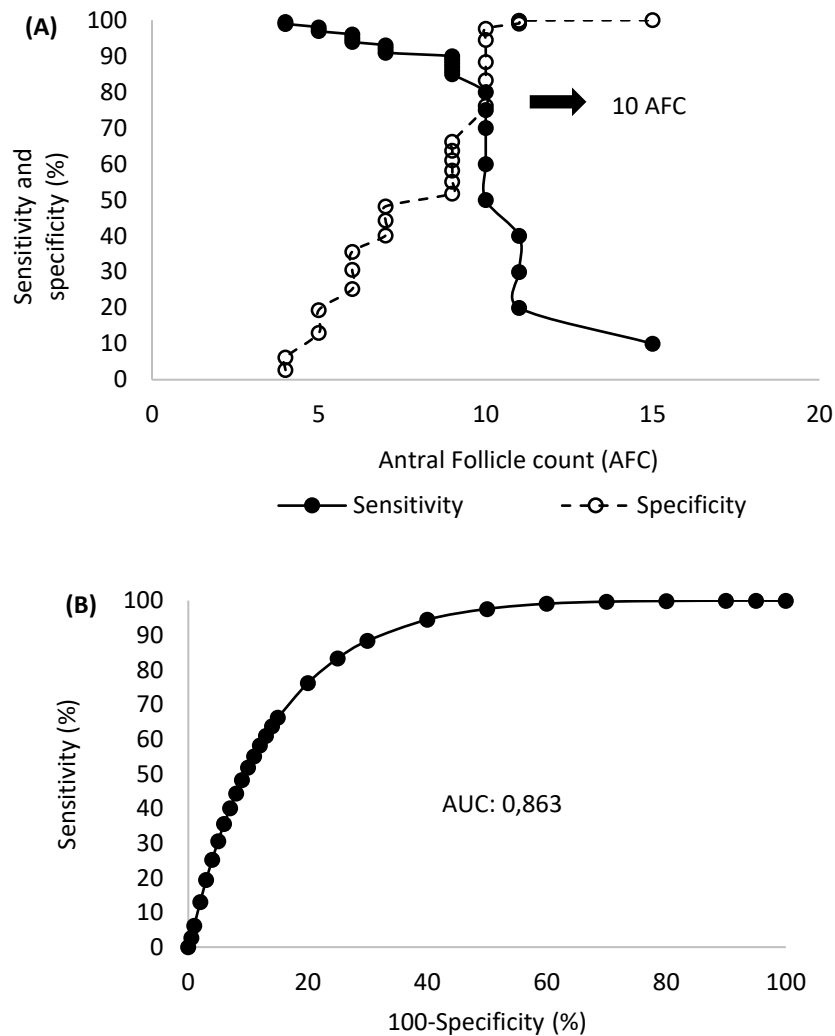


Figure 2. Receiver-operating characteristic (ROC) analysis for determination of the antral follicle count (AFC) threshold for ewe lambs with > 7 corpora lutea after the FSH protocol. Data were obtained from 25 ewe lambs. (A) Sensitivity and specificity curves. Each AFC was selected as a threshold for defining positive and negative test outcomes, ie, ewes with CL > 7 and ≤ 7 , respectively, after the FSH protocol. Diagnostic specificity (Sp) was defined as the probability of a

positive test outcome in an individual with $CL > 7$ after the FSH protocol. Diagnostic sensitivity (Se) was defined as the probability of a negative test outcome in an individual with $CL \leq 7$ after the FSH protocol. Data for Se and Sp are expressed as percentages. (B) ROC plot representation of the data. The AFC threshold of 10 maximized the Youden index.

3.3 Plasma AMH

The plasma AMH concentrations at D0_{eCG} (immediately before the beginning of the eCG pre-selection test, and before any hormonal intervention) showed a weak correlation ($r = 0.34$; $P < 0.05$) with the total number of recovered structures after the FSH treatment. No significant correlations were found between AMH at the D0_{eCG}, and the CL count or the number of viable embryos after the FSH treatment. However, moderate to strong correlations were found between AMH concentrations at D9_{FSH} (time of the first FSH dose) and the CL count, total number of recovered structures and number of viable embryos obtained after the FSH treatment ($r = 0.7$; 0.7 and 0.57 , respectively, $P < 0.05$).

Between the two time points at which AMH was measured (D0_{eCG} and D9_{FSH}), optimum diagnostic performance was observed in D9_{FSH} (Table 1). For this reason, only results for AMH at D9_{FSH} are shown (Figure 3). Data for AMH recorded after an estrus synchronization protocol (D9_{FSH}) were evaluated, in order to determine the AMH threshold values for selecting ewes with a high CL response (> 7) to FSH treatment (Figure 3). For each AMH concentration taken as a possible threshold value, diagnostic sensitivity and specificity were determined (Figure 3A). The area under the ROC curve was significantly

different from the area corresponding to the null hypothesis of a non-informative test ($P < 0.001$, Figure 3B). The plasma AMH concentration at D9_{FSH} which was found to maximize the Youden index was 168 pg/mL, corresponding to high PPV and NPV values.

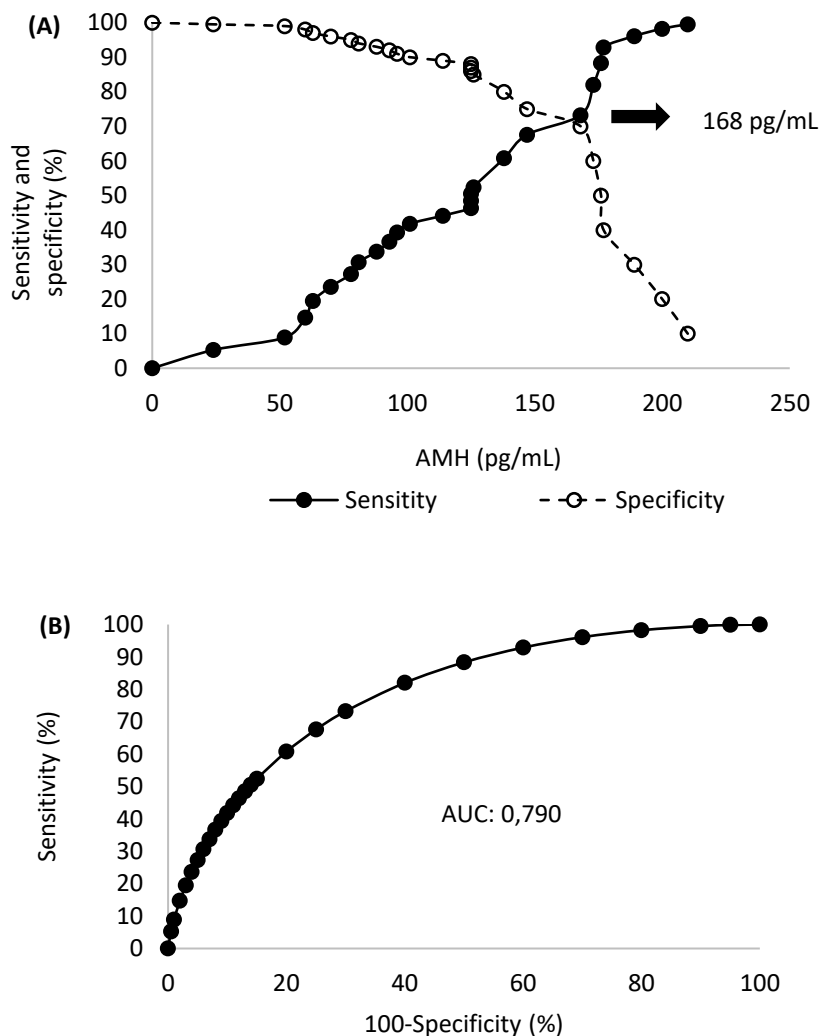


Figure. 3. Receiver-operating characteristic (ROC) analysis for determination of the AMH threshold for ewe lambs with > 7 corpora lutea after the FSH protocol. Data were obtained from 25 ewe lambs. (A) Sensitivity and specificity curves. Each AMH concentration was selected as a threshold to define positive and

negative test outcomes, ie, ewes with CL > 7 and ≤ 7 respectively, after the FSH protocol. Diagnostic specificity (Sp) was defined as the probability of a positive test outcome in an individual with CL > 7 after the FSH protocol. Diagnostic sensitivity (Se) was defined as the probability of a negative test outcome in an individual with CL ≤ 7 after the FSH protocol. Data for Se and Sp are expressed as percentages. (B) ROC plot representation of the data. The AMH threshold of 168 pg/mL maximized the Youden index.

3.4 The responses of the different genotypes

There was no difference between wild type (+/+) or heterozygous ewes (+/E) for the *FecG^E* mutation in terms of CL count (after FSH treatment), total number of recovered structures or number of viable embryos. Heterozygous ewes (+/E) tended to have lower plasma AMH values than wild ewes (P = 0.06) (Table 2).

Table 2. Data of FSH superovulation treatment (mean ± SD) from Santa Ines ewe lambs, wild type (+/+) or heterozygous (+/E) for the *FecG^E* mutation

	Wild type (+/+; n = 7)	Heterozygous (+/E; n = 18)	Total
AMH (pg/mL)	149 ± 39*	109 ± 51*	120 ± 50
CL	8.1 ± 5.1	7.2 ± 4.8	7.5 ± 4.8
RecStruc	7.4 ± 5.0	4.8 ± 3.9	5.6 ± 4.3
ViabEmb	4.6 ± 4.1	3.9 ± 3.1	4.1 ± 3.3

* P = 0.06. *AMH*, plasma anti-Müllerian hormone evaluated at the first FSH dose;

CL, number of corpus luteum; *Rec Struc*, total number of recovered structures;

Viab Emb, number of viable embryos.

3.5 Comparison of screening methods for embryo donors

Figure 4 shows the post-FSH superovulation protocol responses of ewes classified as HR or LR based on the different methods evaluated. Table 1 shows the sensitivity and specificity values, positive and negative predictive values, and the accuracy and Kappa coefficient of the different methods used for screening donors for their potential for in vivo embryo production.

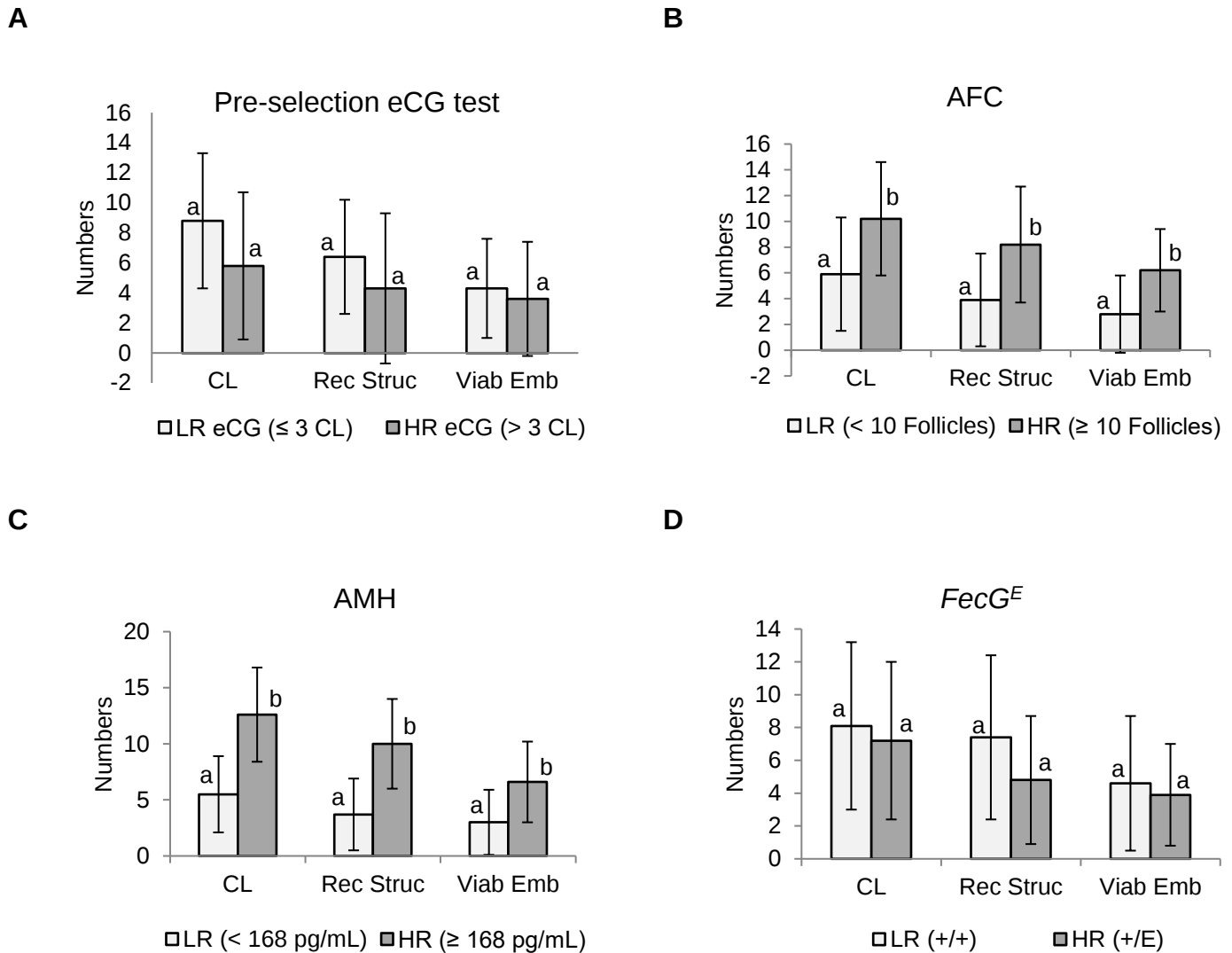


Figure. 4. Comparison of four screening methods used to classify Santa Ines ewe lambs as having low potential of response (LR) or high potential of response (HR) for in vivo embryo production. The screening methods were: **A**– CL count after a pre-selection eCG test (eCG); **B**– antral follicle count, evaluated at the first FSH

dose (AFC); **C**– plasma anti-Müllerian hormone, evaluated at administration of the first FSH dose (AMH); **D**– presence of one allele (+/E), or absence of the *FecGE* mutation (+/+). Thresholds used for each screening method are indicated. CL count, total number of recovered structures (Rec Struc) and number of viable embryos (Viab Emb) after an FSH-based superovulation are presented.

4. Discussion

The results indicated that both AFC and plasma AMH provide accurate methods for selecting sheep with higher potential to MOET (multiple ovulation and embryo transfer). However, these screening methods showed different results at different time points. The optimal moment for AFC and AMH measurement was after the estrus synchronization protocol (D9_{FSH}), and at the emergence of a new follicular wave [14]. After estrus synchronization protocol, the population of small antral follicles is expected to be larger [14], if no influence exists from large follicles or active CL. Additionally, in mammals, AMH production is higher in small, growing follicles [20]. Therefore, D9_{FSH} may be more favorable for AFC and AMH evaluations.

The eCG pre-selection test could not effectively identify ewes with higher potential of response to MOET. Contradictory results have been reported in sheep and goats [2,3]. In our study, ewes underwent SOV at the beginning of a new follicular wave, using the Day 0 protocol [14]. This protocol can optimize the response to SOV, primarily by eliminating the negative effect of large follicles at the beginning of SOV [1,14]. However, even with application of this concept, the positive results previously reported for the eCG test were not repeated under our experimental conditions. Therefore, further investigations

evaluating more hormonal profiles and ovary activity should be performed, in order to explain why and under what circumstances the eCG test can show low efficiency.

The presence of one allele of the *FecG^E* mutation did not improve embryo production. Moreover, the different genotypes (+/+ or +/E) did not influence the response to the FSH treatment. Silva et al [13] reported higher ovulation rates and twinning frequency in sheep homozygous for the *FecG^E* allele (E/E). It is expected that these animals have higher numbers of recruited follicles and also a lower atresia rate, leading to a higher response to the FSH-based superovulation regime. The E/E genotype is found in only 3.9% of ewes in flocks that are not selected for prolificacy, and none of the experimental animals showed this genotype. However, one interesting finding was the tendency ($P = 0.06$) for lower AMH levels in +/E ewes. The *GDF9*, together with other proteins from the *TGF- β* (transforming growth factor- β) superfamily, is known to be an important intraovarian regulator [21]. Moreover, homozygous ewes for the *FecB^B* allele (Booroola mutation) showed lower concentrations of AMH, probably due to lower *BMP* (bone morphogenetic proteins) activity in the ovary. This may occur due to partial loss-of-function in the *BMPR1B* receptor [22]. In this way, lower AMH levels in *FecG^E* ewes may be attributed to lower *GDF9* activity in the granulosa cells, which affects AMH secretion. More detailed investigations should be performed to elucidate the association between *FecG^E* mutation and AMH secretion.

The AFC at D0_{FSH} and at D9_{FSH} showed weak to moderately-positive correlations with the CL count, total number of recovered structures and number of viable embryos after FSH treatment. In cows, the AFC is positively correlated

with the total number of recovered embryos [23,24] and in goats, AFC is positively associated with CL count, in response to SOV [3]. However, in sheep, AFC remains controversial as a screening method for better donors. A recent publication found no significant correlation between AFC and embryo production [2]. Even in studies that reported significant correlations between AFC and subsequent SOV performance, the results were unremarkable [25,26]. Differences in the features of the ultrasound unit or practical skill may lead to imprecise AFC measurements and limit the application of this technique. Unexpectedly, despite the weak to moderate correlation found, AFC at the D9_{FSH} could effectively segregate HR_{AFC_D9FSH} from LR_{AFC_D9FSH} (Figure 2B). Ewes with high AFC (evaluated at the emergence of the first follicular wave) showed a better response to SOV, than ewes with low AFC [27]. Therefore, despite the limitations, AFC performed through ultrasonography could be used to select more productive embryo donors.

It is important to note the strong associations ($P < 0.05$) between the plasma AMH levels at D9_{FSH}, and the CL count and the total number of recovered structures. Similar results have been reported in cows (AMH vs CL after SOV) and goats (AMH vs CL and AMH vs collected embryos, both after SOV) [4,7]. Our findings confirm that plasma AMH levels can be used to select ewes with higher potential of response to in vivo embryo production. One great advantage of AMH measurement is that it is highly reproducible, making it possible to select better donors with a single evaluation [7,20]. The present results also show that, in Santa Ines ewes, AMH measurement should be performed after an estrus synchronization protocol, to improve its efficiency.

When considering the CL count, total number of recovered structures, and number of viable embryos from ewes classified as HR or LR by the different methods (Figures 4A, B, C, and D), only AFC and AMH (both evaluated at D9_{FSH}) could efficiently identify ewes with higher potential of response. These findings have an important field application. Selecting only HR ewes for the SOV protocol could significantly increase or even double the number of embryos produced (Figures 2B and C).

A meta-analysis review, addressing the use of AMH in assisted reproductive technology for humans, showed that AMH serum levels could identify poor responders, with sensitivity and specificity ranging from 0.40 to 0.97, and 0.41 to 1.00, respectively. According to these authors, similar efficiency can be achieved using AFC. Additionally, in women with excessive ovarian response, AMH sensitivity and specificity ranges were between 0.57 and 0.93, and 0.62 and 0.96, respectively [28]. In our study, it was noted that both AFC and AMH (both at D9_{FSH}) are reliable in identifying ewes with poor response to SOV, indicated by high values of sensitivity and NPV. Also, at D9_{FSH}, AFC and AMH methods showed good and moderate agreement, respectively (Kappa coefficient), high accuracy, and satisfactory specificity (Table 1). This confirmed the suitability of these screening tests for segregating HR and LR ewes. It should be stressed that higher MOET efficiency can greatly expand the application of this biotechnology, accelerate genetic improvement of commercial herds, favor the preservation of endangered species, and positively contribute to related research lines.

5. Conclusions

Ewes with higher potential for in vivo embryo production can be selected by AFC or plasma AMH measurement, after an estrus synchronization protocol. Under our experimental conditions, the eCG pre-selection test and genotypes for the *FecG^E* mutation (heterozygous or wild type) could not identify high-responding or low-responding ewes.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' contributions

PHNP: conception and study design, data collection, statistics and creation of the first draft. MFAB: study design, statistics and data collection. LSR, GMB, CRL, and KMS: data collection. EKNA and JMGSF: critical evaluation of the manuscript. JFF and FZB: elaboration of the hypothesis, experimental design and data collection. In addition, all authors contributed to the writing, revision, and approval of the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Danielle Monniaux for her guidance on AMH measurement, and critical evaluation of the manuscript. The authors thank the Universidade Federal Fluminense, Infra-LabPesq/PROPPI, FAPERJ, EMBRAPA (Project 02.13.06.026.00.03) and CNPq (400785/2016-1) for funding this project. FZB and JFF are fellows of the CNPq, JMGSF of CAPES and EKNA of FAPERJ.

References

- [1] Bartlewski PM, Seaton P, Oliveira MEF, Kridli RT, Murawski M, Schwarz T. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology* 2016;86:130-43.
- [2] Bruno-Galarraga M, Cueto M, Gibbons A, Pereyra-Bonnet F, Subiabre M, Gonzalez-Bulnes A. Pre-selection of high and low ovulatory responders in sheep MOET programs. *Theriogenology* 2015;84:784-90.
- [3] Balaro MFA, Brandão FZ, Maia ALRS, Souza-Fabjan JMG, Cueto MI, Gibbons AE, et al. Pre-selection test to identify high responder donors goats. *Reprod Domest Anim* 2016;5:386-91.
- [4] Monniaux D, Baril G, Laine AL, Jarrier P, Poulin N, Cognié J, et al. Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 2011;142:845-54.
- [5] Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003;59:171-88.
- [6] Bartlewski PM, Alexander BD, King WA. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. *Small Rumin Res* 2008;75:210-16.
- [7] Rico C, Fabre S, Médigue C, Clemente N, Clément F, Bontoux M, et al. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biol Reprod* 2009;80:50-9.

- [8] Monniaux D, Rico C, Larroque H, Dalbiès-Tran R. Médigue C, Clément F, et al. L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse à une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynécol Obstét Fertil* 2010;38:465-70.
- [9] Lahoz B, Alabart JL, Cocero MJ, Monniaux D, Echegoyen E, Sánchez P, et al. Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: an endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology* 2014;81:347-57.
- [10] Pramod RK, Sharma SK, Kumar R, Rajan A. Genetics ovulation rate in farm animals. *Vet World* 2013;6:833-38.
- [11] Dufour JJ, Cognié Y, Mermillod P, Mariana JC, Romain RF. Effects of the Booroola *Fec* gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil* 2000;118:85-94.
- [12] Lahoz B, Alabart JL, Folch J, Sánchez P, Echegoyen E, Cocero MJ. Influence of the *FecX^R* Allele in Heterozygous Ewes on Follicular Population and Outcomes of IVP and ET using LOPU-Derived Oocytes. *Reprod Domest Anim* 2013;48:717-23.
- [13] Silva BDM, Castro EA, Souza CJH, Paiva SR, Sartori R, Franco MM, et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim Genet* 2011;42:89-92.
- [14] Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldaña JM. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 2009;72:477-83.
- [15] Balaro MFA, Fonseca JF, Barbosa TGB, Souza-Fabjan JMG, Figueira LM, Teixeira TA, et al. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular

emergence before the superovulatory Day 0 protocol. *Domest Anim Endocrinol* 2016;54:10-14.

[16] Lima JTM, Fonseca JF, Balaro MFA, Esteves LV, Ascoli FO, Leite CR, et al. Effect of natural mating or laparoscopic artificial insemination in superovulated Santa Inês ewes on superovulatory response, fertility and . embryo viability. *Anim Prod Sci* 2015;56:1463-68.

[17] Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé J, et al. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:932-44.

[18] Biase FH, Franco MM, Goulart LR, Antunes RC. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genet Mol Biol* 2002;25:313-5.

[19] Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000;45:23-41.

[20] Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL, et al. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:1-16.

[21] Knigh PG, Glister C. TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006;132:191-206.

[22] Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology* 2016;86:41-53.

[23] Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz Júnior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, et al. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In

Vitro and In Vivo – of *Bos indicus*–*Taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. *Reprod Domest Anim* 2014;49:228-32.

[24] Irland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 2007;22:1687-95.

[25] González-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 presence of corpus luteum at first FSH dosage. *Theriogenology* 2002;58:1607-14.

[26] Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Dominguez V, Cocero MJ. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology* 2005;63:1973-83.

[27] Mossa F, Duffy P, Naitana S, Lonergan P, Evans ACO. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Anim Reprod Sci* 2007;100:391-6.

[28] Broer SL, Mol BW, Dölleman M, Fauser BC, Broekmans FJM. The role of anti-Müllerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22:193-201.

7. CAPÍTULO 2

Color-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep

Ultrassonografia modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia para contagem de corpos lúteos em ovelhas superovuladas

Artigo publicado no periódico: Reproduction in Domestic Animals

Aceito em: setembro de 2017 **DOI:** 10.1111/rda.13089

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

Color-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep

Pedro Henrique Nicolau Pinto¹; Gláucia Mota Bragança¹; Mário Felipe Alvarez Balara¹; Eduardo Kenji Nunes Arashiro¹; Gustavo Bervian dos Santos¹; Guilherme Nunes de Souza²; Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan¹; Jeferson Ferreira Da Fonseca³; Felipe Zandonadi Brandão¹

¹Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil.

²Embrapa Gado de Leite, Minas Gerais, Brazil.

³Embrapa Caprinos e Ovinos, Ceará, Brazil.

Contents

This study evaluated color-Doppler ultrasound imaging (UI) as a substitute for laparoscopy to count the corpora lutea (CL) in superovulated sheep. Twenty-five Santa Ines ewes were superovulated three times at 21-day intervals. Corpora lutea were counted by color-Doppler UI ($CL_{DOPPLER}$) six days after each superovulation and confirmed by laparoscopy (CL_{LAP}) 12 h later. The mean number of CL was similar for both techniques (2.1 ± 2.5 vs. 2.1 ± 2.7 for $CL_{DOPPLER}$ and CL_{LAP} , respectively) with a significant positive correlation ($r=0.94$; $r^2=0.89$). Color-Doppler UI effectively evaluated the ovarian response in superovulated ewes and efficiently identified animals that did not respond to superovulation.

Keywords: Color-Doppler, corpus luteum, laparoscopy, ovary, superovulation.

1. Introduction

Despite efforts to improve superovulatory protocols (SOV) in sheep, variability in ovarian response remains the major limitation in multiple ovulation and embryo transfer (MOET) programs (Bartlewski et al., 2016). Thus, the CL are counted by laparoscopy to determine ovarian response and whether a surgical embryo recovery procedure is justified. Although it is a less invasive surgery, laparoscopy requires care, such as fasting and anesthesia, (Fonseca et al., 2016) similar to other surgical procedures.

Compared to laparoscopy, ultrasound imaging (UI) is a non-invasive, safe procedure that does not require previous preparation (Ginther, 2014). In ewes, B-Mode and color-Doppler UI are used for CL evaluation (Dickie et al., 1999; Figueira et al., 2015). However, most previously published studies evaluated non-

superovulated ewes, and, to the best of our knowledge, color-Doppler UI has never been used to screen responding ewes in MOET programs. Thus, the present study evaluated color-Doppler UI as a laparoscopy substitute for evaluating superovulation in sheep.

2. Materials and methods

This research was approved by the Ethical Committee for Animal Use of the Universidade Federal Fluminense (protocol 699/15).

2.1 Experimental location, animals and design

The experiment was performed at Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos, in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. Nulliparous Santa Ines ewes (n=25) were superovulated three times at 21-day intervals, for a total of 75 SOV. Six days after each SOV, the number of CL per ovary was counted by color-Doppler UI and confirmed by laparoscopy 12 h later.

2.2 Superovulation and mating

Eighty hours after ovulation, SOV was performed using 200 mg of FSH (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada) administered in six decreasing doses every 12 h (50/50, 30/30, 20/20 mg). A sponge containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon®, Zoetis, São Paulo, Brazil) was inserted with the first FSH dose and removed at the fifth dose. Cloprostenol sodium (0.24 mg; Estron®, Tecnopec, São Paulo, Brazil) was administered with the last FSH dose and 0.025 mg of lecilerin (Gestran Plus®, Tecnopec, São

Paulo, Brazil) was administered 24 h later. After the last FSH dose, ewes were bred with fertile Santa Ines rams every 12 h until the end of estrus.

2.3 Corpora lutea count

Six days after the last FSH, the CL number in each ovary was counted by color-Doppler UI (CL_{DOPPLER}) using a portable device (Sonoscape S6®, China) equipped with a 7.5 MHz transrectal linear transducer. After locating the ovary using B-Mode, color-Doppler mode was activated, and the CL number and vascularization were determined. Luteal vascularization was subjectively assessed using an increasing score scale of 1-4 (Figure 1). Only functional CL (score ≥ 2) in each ovary were counted. The Doppler settings used were: 20% color gain, 1.0 kHz pulse repetition frequency, 7 cm depth and a 75 kHz wall filter.

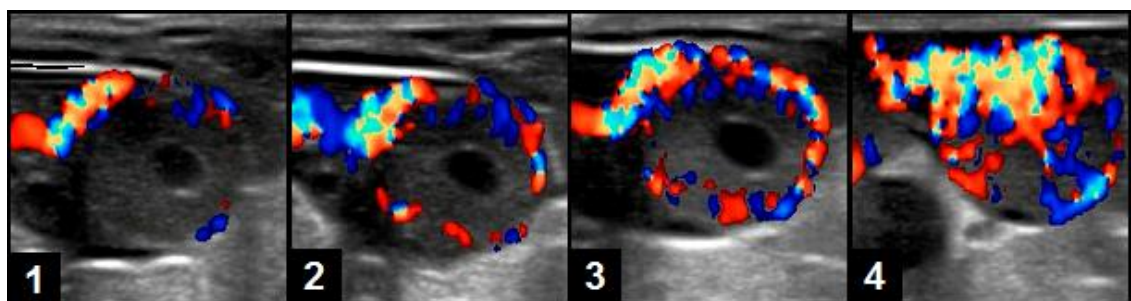


FIGURE 1 Subjective CL vascularization scores (1 to 4) based on the luteal area percentage (0-100%) with colored pixels. Score 1 (0-25%), Score 2 (25-50%), Score 3 (50-75%), and Score 4 (75-100%).

The CL number was confirmed by laparoscopy (CL_{LAP}) 12 h after the ultrasound exam. The laparoscopy procedure was performed per the method of Bruno-Galarraga et al. (2015) under sedation with i.v. acepromazine maleate (0.1 mg/kg, Acepran® 1%, Vetnil, São Paulo, Brazil) and i.v. diazepam

(0.3 mg/kg, Uni-Diazepam[®], União Química, São Paulo, Brazil). Only red-colored CL were considered functional and counted.

2.4 Statistical analysis

The outcome variables, CL_{DOPPLER} and CL_{LAP} (mean±SD), were determined using Kolmogorov-Smirnov's test. Means were compared by a paired Student's t-test. Associations were determined by Pearson's correlation (r) and simple linear regression (r²). Considering CL_{LAP} as the "standard method," the performance of CL_{DOPPLER} as a diagnostic method to determine the number of CL was evaluated by calculating the sensitivity (SENS), specificity (SPEC), positive (PPV) and negative (NPV) predictive values and area under the ROC curve (AUC) at different cutoff points (CL per ovary, 1-9). The kappa coefficient and the area under the ROC curve were determined using the Statistical Package for the Social Sciences, Inc. A P value < 0.05 was considered significant.

3. Results

The CL number counted by color-Doppler ultrasonography (CL_{DOPPLER}) was not significantly different from the CL number counted by laparoscopy (CL_{LAP}) (2.1±2.5 vs 2.1±2.7, respectively). In 70% of the evaluations (105/150), the CL count was the same for both methods. In 16% of the evaluations (24/150), CL_{DOPPLER} was higher than CL_{LAP}, and in 14%, CL_{LAP} was higher than CL_{DOPPLER} (21/150). A positive correlation between CL_{LAP} and CL_{DOPPLER} (r=0.94; r²=0.89; p<0.05, Figure 2) was observed. Ewe ovaries demonstrating both low and high responses, visualized by color-Doppler UI, are illustrated in Figure 3 (A and B,

respectively). The performance of CL_{DOPPLER} as a tool for CL count at different cutoff points (1 to 9 CL per ovary) is presented in Table 1.

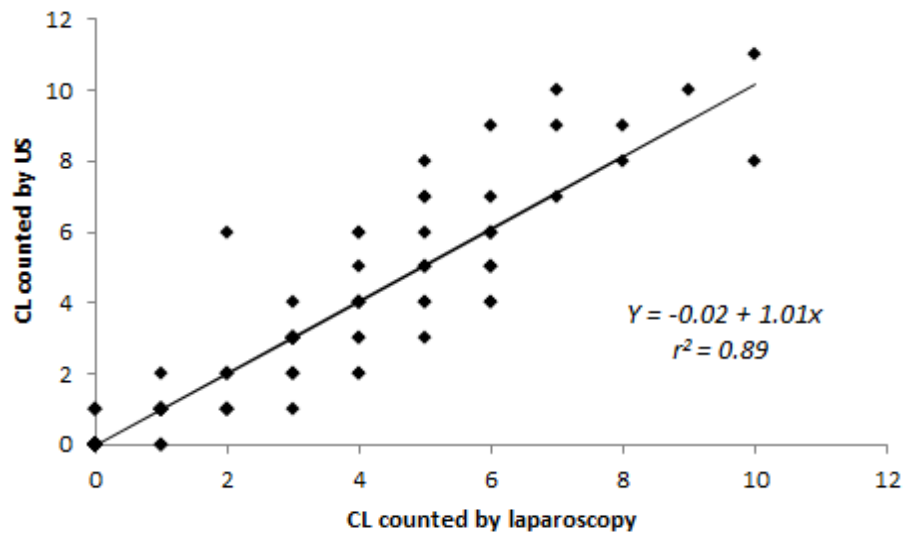


FIGURE 2 Scatterplot showing the correlation ($p < 0.05$) between the CL counted by color-Doppler ultrasound imaging (CL_{DOPPLER}) and by laparoscopy (CL_{LAP}) in superovulated sheep.

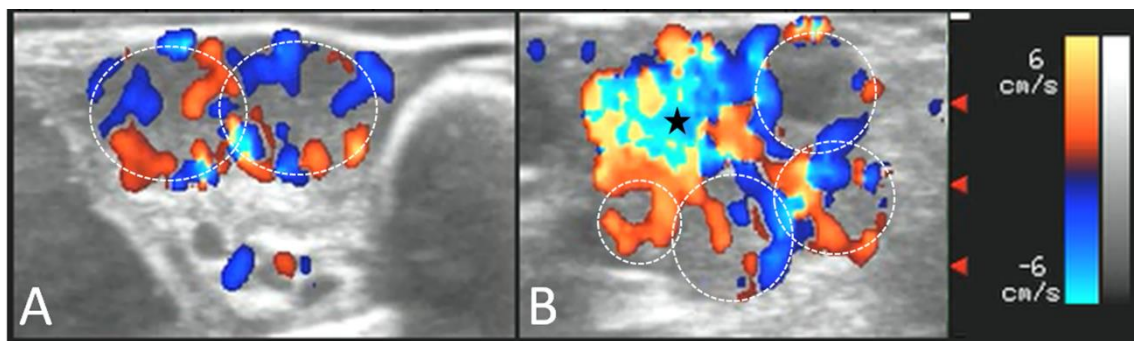


FIGURE 3 Color-Doppler ultrasound imaging of superovulated ovaries in sheep: A - poor response (2 CL) and B - good response (4 CL). Black star indicates ovarian vessels at the hilum. White dashed circles indicate each CL.

TABLE 1 Sensitivity (SENS), Specificity (SPEC), Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV), Kappa index and area under the ROC curve (AUC) of the color-Doppler UI used for CL count.

CL	SENS	SPEC	PPV	NPP	Kappa	AUC
1	0.98	0.93	0.91	0.99	0.95	0.89
2	0.98	0.94	0.89	0.99	0.95	0.84
3	0.95	0.95	0.88	0.98	0.95	0.75
4	0.86	0.96	0.83	0.97	0.94	0.67
5	0.67	0.96	0.74	0.95	0.92	0.61
6	0.61	1.00	1.00	0.96	0.97	0.55
7	0.56	1.00	1.00	0.97	0.97	0.53
8	0.33	0.99	0.67	0.97	0.97	0.52
9	0.33	0.99	0.50	0.99	0.98	0.51

4. Discussion

The results demonstrated a strong correlation between both CL counting methods. The kappa index remained above 91% regardless of the CL number in the ovaries. Viñoles et al. (2004) demonstrated that transrectal UI is as efficient as laparoscopy and laparotomy for detecting CL in non-superovulated sheep. Our results indicate that CL_{DOPPLER} is also as effective as laparoscopy for assessing ovarian response in superovulated sheep.

Previous studies using non-superovulated animals reported that identifying individual CL using UI was difficult and would have limited use in SOV (Dickie et al., 1999; Viñoles et al., 2004). In the present study, the AUC and sensitivity values demonstrated that CL_{DOPPLER} performance decreased when more than 4 CL were present. This was probably due to difficulty in distinguishing individual CL in high numbers. Despite this limitation, when the number of CL was less than 4, the performance parameters of CL_{DOPPLER} were satisfactory (sensitivity $\geq 90\%$ and AUC $\geq 75\%$). Moreover, CL_{DOPPLER} accurately identified

animals with a poor ovarian response, demonstrated by the high specificity and NPP values at all cutoff points. It is crucial that CL evaluation is performed by laparoscopy or laparotomy in ovine MOET programs (Fonseca et al., 2016); however, these procedures can injure and impair the animal's reproductive capacity (Dickie et al., 1999; Fonseca et al., 2016).

Real world scenarios regarding assisted reproductive technology and animal well-being will likely lead to reducing or prohibiting successive surgical procedures in the same animal (Fonseca et al., 2013). Thus, color-Doppler UI can be used to remove poorly responding ewes from MOET programs, avoiding unnecessary surgical procedures. Animal welfare is a growing concern in research, and livestock production practices and ultrasound exams as “clean and ethical” techniques (Myamoto et al., 2006) are an excellent laparoscopy substitute for evaluating SOV in sheep.

These results support the hypothesis that color-Doppler UI can substitute laparoscopy to assess ovarian response in superovulated ewes, although the procedure's accuracy decreases when more than 4CL are present.

Acknowledgements

The authors thank FAPERJ, CNPq (400785/2016-1), and Embrapa (Project 02.13.06.026.00.03) for financial support.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Bartlewski, P. M., Seaton, P., Oliveira, M. E. F., Kridli, R. T., Murawski, M., Schwarz T. (2016). Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, 86, 130-143. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.024
- Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M., González-Bulnes, A. Pre-selection of high and low ovulatory responders in sheep MOET programs. *Theriogenology*, 84, 784-790, (2015). doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.011
- Dickie, A. M., Paterson, C., Anderson, J. L. M., Boyd, J. S. (1999). Determination of corpora lutea numbers in Booroola-Texe ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, 51, 1209-1224. doi:10.1016/S0093-691X(99)00066-7
- Figueira, L. M., Fonseca, J. F, Arashiro, E. K. N., Souza-Fabjan, J. M. G., Ribeiro, A. C. S., Oba, E., Viana, J. H. M., Brandão, F. Z. (2015). Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 643-650. doi:10.1111/rda.12543
- Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Leite, C. R., Nascimento-Penido, P. M. P., Brandão, F.Z., Lehloenya, K. C. (2016) Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 86, 144-151. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.025

Fonseca, J. F., Zambrini, F. N., Alvim, G. P., Peixoto, M. G. C. D., Verneque, R. S., Viana, J. H. M. (2013). Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminant Research*, 111, 96-99. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.08.007

Ginther, O. J. (2014). How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*, 81, 112-125. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.007

Miyamoto, A., Shirasuna, K., Hayashi, K. G., Kamada, D., Kawashima, C., Kaneko, E., Acosta, T. J., Matsui, M. A. (2006). Potential Use of Color Ultrasound as a Tool for Reproductive Management: New Observations Using Color Ultrasound Scanning that were not Possible with Imaging Only in Black and White. *Journal of Reproduction Development*, 52, 153-60. doi:10.1262/jrd.17087

Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M. (2004). Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Animal Reproduction Science*, 80, 69-79. doi:10.1016/S0378-4320(03)00141-6

8. CAPÍTULO 3

Sucessive superovulatory treatment in Santa Ines sheep

Tratamentos superovulatórios consecutivos em ovelhas Santa Inês

Artigo submetido ao periódico: Tropical Animal Health and Production

Em: maio de 2018

Qualis: B1– Medicina Veterinária

Successive *in vivo* embryo production in Santa Ines sheep

Pedro Henrique Nicolau Pinto^a; Mario Felipe Alvarez Balaro^a; Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva^a; Viviane Lopes Brair^a; Vivian Angélico Pereira Alfradique^a; Luana Rangel Côrtes^a; Isabel Oliveira Cosentino^a; Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan^a; Jeferson Ferreira da Fonseca^b; Felipe Zandonadi Brandão^a

^aFaculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho n.º 64, CEP 24230-340, Niterói, RJ, Brazil.

^bEmbrapa Caprinos e Ovinos, Núcleo Regional Sudeste, Rodovia MG 133 Km 42, CEP 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brazil.

Corresponding author: pedropintoufpr@gmail.com; fzbrandao@id.uff.br

Abstract

This study aimed to verify i) if a previous response to superovulation (SOV) can be used as a criterion to select ewes for *in vivo* embryo production, and ii) if the intensity of the SOV response (number of corpora lutea, abbreviated CL) can affect the embryo recovery rate. A total of 25 Santa Ines ewes underwent SOV three times (SOV1, SOV2, and SOV3) using 200 mg of FSH and natural mating. The number of CL before embryo recovery was determined by laparoscopy and by Color-Doppler ultrasonography. Strong correlations were observed between SOV2 and SOV3 in terms of the numbers of CL ($r = 0.86$; $r^2 = 0.74$; $p < 0.0001$) and viable embryos ($r = 0.79$; $r^2 = 0.63$; $p < 0.0001$). However, no correlations were observed between SOV1 and SOV2 or between SOV1 and SOV3. Recovery rate did not differ with the intensity of the SOV response (≤ 6 ; 7-10; > 10 CL), regardless of the method used for the CL count. Therefore, in hair ewes, a previous response to SOV only partially explains the potential for *in vivo* embryo production, and the intensity of the response to SOV does not affect recovery rate.

Keywords: tropical hair sheep, MOET, embryo production, repeatability.

Introduction

Santa Ines is the most reared sheep breed in Brazil. This hair sheep has good maternal ability, minimal reproductive seasonality, and is adapted to tropical conditions (Balaro et al. 2014). These favorable traits allow this breed to be reared in Mexico, South Africa, and in many countries of South America (Santana Jr et al. 2013).

In sheep production, assisted reproductive technologies (ART) are used to diminish reproductive inefficiencies and accelerate genetic gain. One ART that stands out, due to its capability to accelerate genetic gain, is the multiple ovulation and embryo transfer (MOET) (Cognié et al. 2003), also known as *in vivo* embryo production. Recently, our group demonstrated that it is possible to select ewes with better response to superovulation (SOV) based on the antral follicular count (AFC) and the plasmatic concentration of the anti-Müllerian hormone (AMH) (Pinto et al. 2018). However, it has not been established whether animals with a superior response to SOV usually repeat this performance in successive treatments.

It has been observed in goats and cattle that satisfactory performance in SOV is highly repeatable in consecutive protocols (Taneja et al. 2000; Monniaux et al. 2011). In wool sheep, moderate to high correlations have been reported among ovulation rates in consecutive SOV (Bari et al. 2001; Bruno-Galarraga et al. 2014). This feature has great applicability since the results of screening tests like AFC, AMH, or even a first MOET program could be used to select animals that will produce more embryos in subsequent SOV. To the best of our knowledge, there are no reports evaluating the repeatability of responses to *in vivo* embryo production in tropical hair sheep such as the Santa Ines ewes.

The assessment of the number of corpora lutea (CL) after SOV, traditionally performed using laparoscopy, is a well-established proxy to determine which animals are worth submitting to embryo recovery (Cordeiro et al. 2003; Bruno-Galarraga et al. 2014). Such a procedure screens out animals with low expectations for embryo production. We have recently

demonstrated that the CL count in sheep donors can be performed using Color-Doppler ultrasonography (US) (Pinto et al. 2017). However, there are no reports evaluating whether the intensity of the SOV response (low, medium, or high) could influence the recovery rate. If significant, this information could define new parameters for determining which animals will be submitted to embryo recovery. Therefore, this study aimed i) to verify if Santa Ines ewes maintain similar embryo production patterns when subjected to three successive SOV, and ii) to evaluate if the intensity of the SOV response, quantified by the number of CL as determined by either laparoscopy or Color-Doppler UI, affects the embryo recovery rate.

Material and Methods

This research was approved by the Ethical Committee for Animal Use of the University (protocol 699/15) and conducted under the ethical principles of the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Experimental location, animals, and design

The experiment was conducted at the Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UniPECO) in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil (22° S latitude). We used nulliparous Santa Ines ewe lambs (n = 25) that had been approved in clinical evaluations and presented good body condition scores (2.8 ± 0.3 , on a scale of 1 being emaciated to 5 being obese). Animals were kept in a confined system and fed with chopped Napier grass (*Penisetum purpureum* vs. Cameron) and concentrate to meet maintenance

requirements. The same flock, under the same rearing conditions, was submitted to three successive MOET protocols for data collection.

Superovulation protocol and mating

Animals underwent the SOV protocol after a short estrus synchronization protocol, during which a sponge impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP; Progespon, Schering Plough, São Paulo, Brazil) was maintained for six days. One day before sponge removal, 300 IU of eCG (Novormon, Schering Plough, São Paulo, Brazil) and 0.24 mg of cloprostenol sodium (Estron, Tecnopec, São Paulo, Brazil) were administered intramuscularly (IM). Thirty-six hours after sponge removal, 0.025 mg of lecorelin (Gestran Plus, Tecnopec, São Paulo, Brazil) was administered IM. The SOV started 80 h after sponge removal using 200 mg of FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada) administered every 12 h in a tapering dose (50/50, 30/30, 20/20 mg). At the first FSH dose, a new sponge was inserted and maintained until the fifth dose. Together with the last FSH dose, 0.24 mg of cloprostenol sodium was administered and, 24 h later, 0.025 mg of lecorelin was administered, both IM. All FSH was from the same batch. Ewes were naturally mated by fertile Santa Ines rams every 12 h, from the last FSH dose to the end of estrus. We observed an interval of 21 days from the end of one protocol (embryo recovery) to the beginning of the next (first sponge insertion) (Fig. 1).

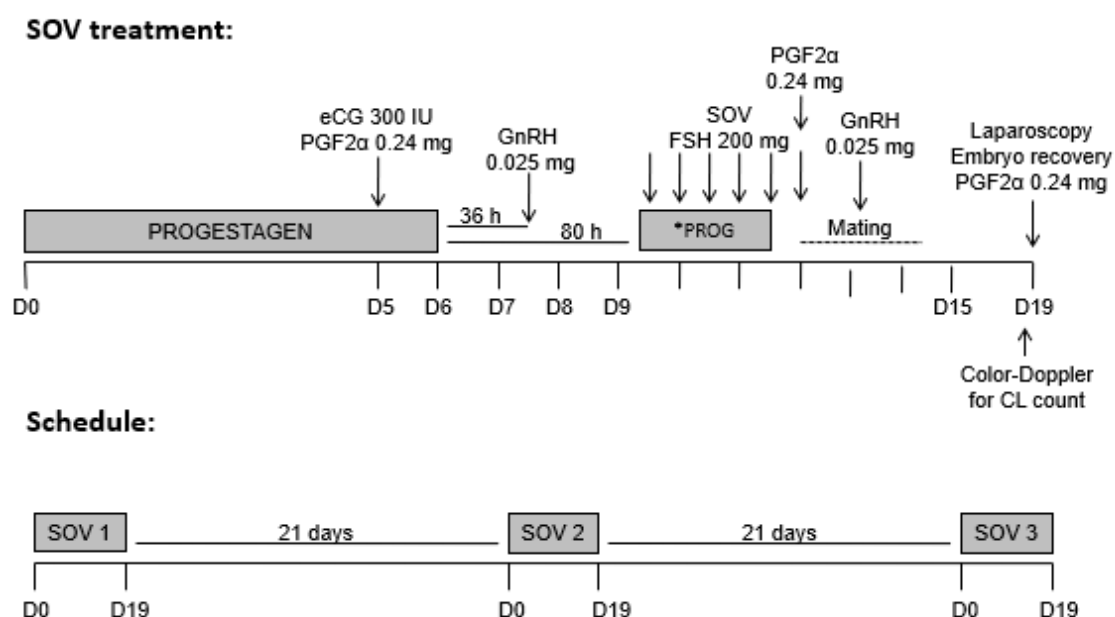


Fig. 1 Schematic representation of the FSH SOV protocol, intervals among SOV treatments, and moment of CL count by Color-Doppler ultrasound imaging and laparoscopy. PROG = progestogen (60 mg of medroxyprogesterone acetate)

Ultrasonographic evaluation

Transrectal B-Mode US was performed to quantify the number of small (< 3 mm), medium (3-5 mm), and large ($\geq$ 5 mm) follicles after each of the three SOV protocols. A portable device (SonoScape S6, SonoScape, Shenzhen, China) equipped with a 7.5 MHz linear transducer was used. The follicular population was assessed every 24 h from the first FSH dose (D9) until the last FSH dose (D12). Six days after the last FSH dose (12 h before embryo recovery), ewes were submitted to new US evaluation for CL count. The ovary was located using B-Mode, Color-Doppler mode was activated, and

the number of functional CL was determined, as previously described (Pinto et al. 2017). Ewes were assigned to one of three categories according to the number of CL counted in Color-Doppler mode: ≤ 6 , 7-10, or > 10 CL_{DOPPLER}. We used the following Doppler settings: 20% color gain, 1.0 kHz pulse repetition frequency, 7 cm depth, and a 75 kHz wall filter. The same technician performed all the US evaluations.

Embryo recovery

Females were deprived of food and water for 24 h and 12 h, respectively, and then were submitted to general anesthesia (Lima et al. 2015). Immediately before embryo recovery, CL and ovarian cysts were counted by laparoscopy, as already described (Bruno-Galarraga et al. 2015); ewes were submitted to embryo recovery only if they had three or more functional CL. Embryos were surgically recovered via longitudinal ventral laparotomy. After uterus exposure, an 18-gauge IV catheter (BD, New jersey USA) was inserted near the utero-tubal junction, and the uterine lumen received an injection of 40 mL of warmed (37°C) buffered phosphate solution (DMPBS, Biodux, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% adult bovine serum (Nutricell, São Paulo, Brazil). This flushing medium was recovered using a Foley catheter (size 08 Fr) inserted at the external bifurcation of the uterine horns. Flushing content was recovered in 50 mL Falcon tubes and sent for evaluation. During the recovery procedure, the genital tract was washed constantly with heparinized saline solution (5 IU/mL) (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brazil) at 37°C. Embryo morphologies were evaluated under a stereomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan) using a magnification from 20 to 40x.

End points

We determined the following end points: estrus response after SOV (number of ewes in estrus/number of treated ewes x 100); time to estrus onset (interval from sponge removal to first mating); estrus length (interval from the first to last mating); ewes that responded to the SOV protocol (≥ 3 CL at laparoscopy); percentage of ovarian cysts at laparoscopy; number of CL at laparoscopy; number of CL at Color-Doppler US, total recovered structures; and numbers of viable, non-fertilized, and degenerated embryos. We additionally calculated the rates of recovery (total structures/CL counted x 100), viability (viable embryos/total structures x 100), non-fertilization (unfertilized structures/total structures x 100), and degeneration (degenerated embryos/total structures x 100). For “total structures,” we included oocytes and degenerated and viable embryos.

Statistical analysis

Data were tested for normality by the Lilliefors test. The normally-distributed variables were compared by Analysis of Variance (ANOVA) and differences between means were evaluated by the Student's T-test. Fisher's Exact test or Chi square test was used to compare the proportion of ewes displaying estrus, SOV, and ovarian cyst. The nonparametric variables were compared by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Statistical analyses of the rates of recovery, viability, fertilization, and degeneration were performed after the transformation of each percentage to the arcsine square root. Pearson correlation coefficient, simple linear regression, and intra-class correlation coefficient (ICC) were determined to evaluate the repeatability of

response between each SOV protocol. The Statistical Analysis System program (SAEG 9.0, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil) was used, and we considered a 5% significance level for all tests.

Results

The follicular population (small, medium, and large) did not differ ($p > 0.05$) at D9 (first FSH dose) among the three repetitions of SOV. There was similar increase of medium follicles population throughout SOV (D9 to D12) among the three repetitions. There were fewer large follicles at D12 at SOV3 (1.4 ± 1.9), and a similar number at SOV1 and SOV2 (3.3 ± 2.6 and 3.0 ± 2.1 , respectively). None of the estrous parameters differed between successive SOV protocols (Table 1). The percentage of ewes showing ovarian cysts after FSH treatment was higher at SOV3 (Table. 1).

The number of CL at SOV2 and SOV3 showed strong positive correlations ($r = 0.86$; $r^2 = 0.74$; $p < 0,0001$) and good agreement (ICC 0.74; $p < 0,0001$). However, the number of CL dropped ($p < 0.05$) after SOV1 (Table 1) and did not correlate with the number of CL from SOV2 or SOV3. No premature CL regression was observed. Viable embryos data followed the same pattern, with correlation found only between SOV2 and SOV3 ($r = 0.79$; $r^2 = 0.63$; $p < 0,0001$), and with fair agreement (ICC 0.56; $p < 0.01$).

Table 1 Estrous parameters, number of CL, and embryo yield of Santa Ines ewes submitted to three successive FSH-based (200 mg total) SOV protocols, naturally mated, and submitted to surgical embryo recovery. Data are expressed as percentage or mean $\pm$ SD. Minimum and maximum values are presented in parentheses (min - max) beside data (when applicable)

	SOV1	SOV2	SOV3	Total
Rate of estrous response after SOV (%)	88.0 (22/25)	72.0 (18/25)	64.0 (16/25)	74.6 (56/75)
Time to estrous onset (h)	33.3 $\pm$ 7.3 (24 - 48)	41.3 $\pm$ 13.2 (24 - 72)	41.3 $\pm$ 12.4 (24 - 72)	38.1 $\pm$ 11.5
Estrus length (h)	47.5 $\pm$ 19.4 (24 - 84)	39.3 $\pm$ 14.1 (12 - 60)	42 $\pm$ 18.6 (12 - 72)	43.3 $\pm$ 17.7
Rate of ewes that responded to SOV ($\geq$ 3 CL) (%)	76.0 (19/25) ^a	36.0 (9/25) ^b	24.0 (6/25) ^b	45.3 (34/75)
Corpora lutea	7.5 $\pm$ 4.8 ^a (0 - 16)	3.0 $\pm$ 5.0 ^b (0 - 20)	2.2 $\pm$ 3.5 ^b (0 - 13)	4.2 $\pm$ 5.0
Ovarian cysts rate (%)	28.0 (7/25) ^a	36.0 (9/25) ^{ab}	60 (15/25) ^b	41.3 (31/75)
Recovered structures	5.4 $\pm$ 4.4 ^a (0 - 16)	1.8 $\pm$ 4.0 ^b (0 - 17)	1.2 $\pm$ 2.3 ^b (0 - 9)	2.8 $\pm$ 4.1
Viable embryos	4.0 $\pm$ 3.5 ^a (0 - 10)	1.2 $\pm$ 3.0 ^b (0 - 12)	1.1 $\pm$ 2.1 ^b (0 - 9)	2.1 $\pm$ 3.2
Non-fertilized structures	0.2 $\pm$ 0.5 (0 - 2)	0.04 $\pm$ 0.2 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0.1 $\pm$ 0.3
Degenerated structures	0.8 $\pm$ 1.5 (0 - 6)	0.2 $\pm$ 1.2 (0 - 6)	0 (0 - 0)	0.3 $\pm$ 1.1
Recovery rate (%)	75.5 ^a (0 - 100)	52.1 ^b (0 - 100)	48.4 ^b (0 - 69.2)	64.5
Viability rate (%)	73.1 (0 - 100)	74.7 (0 - 100)	89.3 (75 - 100)	77.1
Non-Fertilization rate (%)	5.0 (0 - 50)	1.0 (0 - 5.9)	0 (0 - 0)	3.1
Degeneration rate (%)	12.9 (0 - 50)	16.7 (0 - 100)	0 (0 - 0)	10.7

SOV1 = first superovulation; SOV2 = second superovulation; SOV3 = third superovulation.

Different lowercase letters in the same row differ statistically ($p < 0.05$)

The recovery rates were lower ($p < 0.05$) at SOV2 and SOV3 (Table 1). The recovery rate did not differ between females with different degrees of response to the SOV protocol (stratified by number of CL: ≤ 6 , 7-10, >10) (Table 2). Also, there was no difference in the recovery rate between the two methods used for CL count (laparoscopy and Color-Doppler US) (Table 2). Post-surgical adhesions were observed in the second and third embryo recovery procedures: four ewes showed adhesions between the omentum and the abdominal wall (right below the incision). At the third embryo recovery procedure, six ewes showed adhesions between the omentum and the abdominal wall (right below the incision), and two animals presented adhesions between the uterine horns.

Table 2 Recovery rate, determined using two methods for CL count, in Santa Ines ewe lambs submitted to three successive FSH-based SOV protocols

Recovery rate (%) using the CL number determined by laparoscopy					Recovery rate (%) using the CL number determined by Color-Doppler UI			
CL	≤ 6	7-10	> 10	Total	≤ 6	7-10	> 10	Total
SOV1	73.3 (5) ^{aA}	75.7 (7) ^{aA}	76.9 (7) ^{aA}	75,5 (19)	60.4 (8) ^{aA}	70.8 (7) ^{aA}	87.2 (6) ^{aA}	71.5 (21)
SOV2	43.3 (5)	85.7 (1)	55.6 (3)	52,1 (9)	60.0 (2)	60.7 (4)	100.0 (1)	66.1 (7)
SOV3	33.5 (2)	51.4 (3)	69.2 (1)	48,4 (6)	47.2 (3)	59.0 (4)	DNO (0)	53.9 (7)
Total	54.2	70.0	70.4	64.5	57.3	65.0	89.0	66.9

Different lowercase letters in the same row differ statistically ($p < 0.05$) between CL categories (≤ 6 , 7-10, >10) in the method of CL count (laparoscopy or Color-Doppler UI). Different capital letters in the same row differ statistically ($p < 0.05$) between methods used for CL count in the same

class of response (e.g., recovery rate in the ≤ 6 category at laparoscopy, compared to recovery rate in the ≤ 6 category at Color-Doppler US). Due to the low number of observations in each CL category at SOV2 and SOV3, statistical analysis was performed only for SOV1.

SOV1, SOV2, and SOV3 = first, second, and third superovulations, respectively. DNO = data not observed (no ewe in this category)

Discussion

The strong correlation in the number of CL and viable embryos between SOV2 and SOV3 indicate that ewes can maintain a pattern of response when submitted to successive SOV protocols. However, responses from SOV1 did not correlate with subsequent treatments. This finding deviate from others in the SOV literature. Goats submitted to successive SOV treatments showed highly repeatable responses for the number of CL and the number of collected and transferable embryos (r^2 varying between 0.67 and 0.68, $p < 0.001$) (Monniaux et al. 2011). In wool sheep, significant correlations have been reported between the ovulation rate ($r = 0.55$; 0.84) (Bari et al. 2001; Bruno-Galarraga et al. 2014) and the number of embryos recovered ($r = 0.38$) (Bari et al. 2001). Two previous studies submitted the same flock of tropical hair sheep to successive SOV protocols but did not evaluate the repeatability of response, only the total amount of embryos produced (Cordeiro et al. 2003; Lima et al. 2015). Nevertheless, it was reported that animals that failed the first SOV treatment subsequently failed in the second trial (Cordeiro et al. 2003). These findings indicate that intrinsic characteristics that influence

ovulation rate can be repeatable within animals and may be used as criteria to select donors.

The percentage of non-responding ewes at SOV2 and SOV3 surpassed the number usually reported for Santa Ines sheep (Cordeiro et al. 2003; Souza-Fabjan et al. 2017). Refractoriness to FSH in successive SOV has not been reported in this breed (Bari et al. 2001; Cordeiro et al. 2003; Lima et al. 2015) and our data did not suggest that, either; the increase in the number of medium follicles throughout SOV did not differ between treatments. We hypothesize that the low ovulation rates observed at SOV2 and SOV3 occurred because the LH surge was not enough to induce ovulation. Chakraborty et al. (1974) showed that continuous infusion with synthetic LH releasing hormone diminishes pituitary LH content and concentration. Also, we found an increase in the number of ovarian cysts observed at SOV3, indicating that follicular growth was induced but ovulation failed. Besides that, our protocol included estrus synchronization prior to each SOV treatment, demanding successive LH surges in short intervals. In studies that used longer periods between SOV treatments, ewes did not show lower ovulation rates in successive treatments (Bari et al. 2001; Cordeiro et al. 2003, Lima et al. 2015). These longer periods between successive treatments may have allowed LH reserves to replenish. Thus, different approaches should be taken to evaluate if short intervals between induced ovulations can drain the LH reserve to an extent that will hamper subsequent ovulations.

We did observe post-operative adhesions after successive surgical embryo recovery procedures, which are known to lead to lower recovery rates, as is well documented in the literature (Torres and Sevellec 1987; Bruno

Galarraga et al. 2014). Adhesions can even make it infeasible to flush uterine horns in some ewes (Forcada et al. 2011; Bruno Galarraga et al. 2014). In our study, despite the decrease in recovery rate, even the ewes that were submitted to three surgical interventions were still able to have the uterine horns exposed and flushed. The constant washing of the reproductive tract with heparinized saline solution may have had a beneficial effect, limiting surgical adhesion formation, as hypothesized by Cordeiro et al. (2003). No statistical difference was observed between the recovery rates of groups with different intensities of SOV response (CL count ≤ 6 , 7-10, > 10) and the two methods for CL count (laparoscopy or Color-Doppler US). It therefore is possible to estimate the number of embryos that will be recovered using the number of CL determined by Color Doppler US or by laparoscopy. A reliable estimation of the number of recoverable embryos can contribute to the organization of procedures and inform the destination of embryos. Such logistic support is especially important in embryo technology research.

In conclusion, ewes exhibit a pattern of response in successive SOV protocols; however, we could not determine the circumstances in which this repeatability of response will occur. The recovery rate is not affected by the intensity of the SOV response, regardless of the method used for CL count.

Acknowledgments

The authors thank the Federal Fluminense University, Infra-Lab Pesq/PROPPI, Embrapa (Project 02.13.06.026.00.02), FAPERJ, and CNPq

(400785/2016-1) for funding the project. FZB and JFF are fellows of the CNPq, JMGSF of CAPES, and EKNA of FAPERJ.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

Balaro, M.F.A, Fonseca, J.F., Oba, E., Cardoso, E.C., Brandão, F.Z., 2014. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? *Tropical Animal Health and Production*, 46, 1533–1537.

Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray, A., Merrel, B., 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56, 147–155.

Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M., González-Bulnes, A., 2015. Pre-selection of high and low ovulatory responders in sheep MOET programs. *Theriogenology*, 84, 784–790.

Bruno-Galarraga, M.M., Cueto, M., Gibbons, A.E., Pereyra-Bonnet, F., Catalano, R., González-Bulnes, A., 2014. Repeatability of superovulatory

response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research*, 124,84–89.

Chakraborty, P.K., Adams, T.E., Tarnavsky, G.K., Reeves, J.J., 1974. Serum and pituitary LH concentrations in ewes infused with LH-RH/FSH-RH. *Journal of Animal Science*, 39, 1150–1157.

Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59, 171–188.

Cordeiro, M.F., Lima-Verde, J.B., Lopes-Junior, E.S., Teixeira, D.I.A., Farias, L.N., Salles, H.O., Simplício, A.A., Rondina, D., Freitas, V.J.F., 2003. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research*, 49, 19–23.

Forcada, F., Ait Amer-Meziane, M., Abecia, J.A., Maurel, M.C., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., Asenjo, B., Vázquez, M.I., Casao, A., 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*, 75, 769–776.

Lima, J.T.M., Fonseca, J. F., Balara, M. F. A., Esteves, L. V., Ascoli, F.O., Leite, C.R., Ribeiro, A.C.S., Delgado, K. F, Souza-Fabjan, J. M. G., Torres

Filho, R. A., Brandão, F. Z., 2015. Effect of natural mating or laparoscopic artificial insemination in superovulated Santa Inês ewes on superovulatory response, fertility and embryo viability. *Animal Production Science*, 56, 1463–1468.

Monniaux, D., Baril, G., Laine, A.L., Jarrier, P., Poulin, N., Cognié, J., Fabre, S., 2011. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction*, 142, 845–854.

Pinto, P.H.N., Bragança, G.M., Balaro, M.F.A., Arashiro, E.K.N., Santos, G.B., Souza, G.N., Souza-Fabjan, J.M.G., Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2017. Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 00, 1–4.

Pinto, P.H.N., Balaro, M.F.A., Souza-Fabjan, J.M.G., Ribeiro, L.S., Bragança, G.M., Leite, C.R., Arashiro, E.K.N., Silva, K.M.; Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2018. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecG^E mutation or eCG pre-selecting tests. *Theriogenology*, 113, 146–152.

Santana Jr, M.L., Bignardi, A.B., Eler, J.P., Cardoso, F.F., Ferraz, J.B.S., 2013. Genotype by environment interaction and model comparison for growth traits of Santa Ines sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 130, 394–403.

Souza-Fabjan, J.M.G., Rosa, R.M., Balaro, M.F.A., Pinto, P.H.N., Santos, G.B., Arashiro, E.K.N., Fonseca, J.F., Ungerfeld, R., Brandão, F.Z., 2017. Effect of different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. *Theriogenology*, 103, 24–29.

Taneja, M., Bols, P.E.J., Velde, A.V., Ju, J.C., Schreiber, D., Tripp, M.W., Levine, H., Echelard, Y., Riesen, J., Yang, X., 2000. Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. *Biology of Reproduction*, 62, 206–213.

Torres, S., Sevellec, C., 1987. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, 27, 859–863.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variabilidade de resposta à superovulação e a necessidade de etapas cirúrgicas são pontos que encarecem e limitam a aplicação da produção *in vivo* de embriões ovinos. Por isso, dois tópicos que merecem destaque nesta série de experimentos são: 1 – a indicação de uma técnica não cirúrgica para avaliação da resposta superovulatória e 2 – a demonstração de dois métodos eficientes para selecionar ovelhas com maior potencial para a produção *in vivo* de embriões. Ainda, informações levantadas na presente tese abrem margem para novas pesquisas, como por exemplo, a relação entre a mutação FecG^E e a produção de AMH. Há também, a necessidade de elucidar em que condições a repetibilidade de resposta poderia ser utilizada como ferramenta para triagem de doadoras de embrião.

10. CONCLUSÕES

- Ovelhas com alto potencial para produção *in vivo* de embriões podem ser selecionadas pela CFA ou pela concentração plasmática de AMH, determinadas após um protocolo de sincronização de estro.
- O eCG-teste e os diferentes genótipos (heterozigotas ou tipo selvagem) para a mutação FecG^E não são capazes de segregar ovelhas com alto de ovelhas com baixo potencial para produção *in vivo* de embriões
- A US modo Doppler colorido pode substituir a laparoscopia na avaliação da resposta superovulatória em ovelhas doadoras de embrião.
- Não é possível determinar quando haverá repetibilidade de resposta em ovelhas submetidas à sucessivas superovulações

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, E.L. et al. Estimation of genetic parameters and genetic changes for growth characteristics of Santa Ines sheep. *Genetics and Molecular Research*, v.15, p.1-12, 2016.

ANDERSON, R.A. et al. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: When and for whom is it indicated? *Maturitas*, v. 71, p. 28-33, 2012.

BALARO, M.F.A. et al. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, p. 1533-1537, 2014.

_____. Pre-selection test to identify high responder donors goats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 51, p. 386-391, 2016.

_____. Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow assessment, luteal biometry, and hormonal assay. *Theriogenology*, v. 95, p. 118–126, 2017.

BALDRIGHI, J.M. et al. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 1015–1020, 2014.

BARI, F. et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, v.56, p.147-155, 2001.

BARTLEWSKI, P.M. et al. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, v.75, p.210–216, 2008.

_____. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, v. 86, p. 130-143, 2016.

BARUSELLI, P.S. et al. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal Reproduction*, v.12, p. 487-497, 2015.

BIASE, F.H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, p. 313-315, 2002.

BOLLWEIN, H. et al. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, v. 32, p. 149–164, 2016.

BRASIL, O.O. et al. Situação atual da superovulação em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.38, p.147-153, 2014.

BRUNO-GALARRAGA, M.M. et al. Pre-selection of high and low ovulatory responders in sheep MOET programs. *Theriogenology*, v. 84, p. 784-790, 2015.

_____. Repeatability of sueroovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research*, v. 124, p. 84-89, 2014.

CLAES, A. et al. Biological Functions and Clinical Applications of Anti-Müllerian Hormone in Stallions and Mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 32, p. 451-464, 2016.

COGNIÉ, Y. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.

_____. Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 112, p. 379-386, 1998.

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

COSTA, J.J.N. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 36, p. 225-238, 2012.

DAVIS, G.H. et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. v.25, p. 525-529, 1982.

_____. Ovulation response to pregnant mares` serum gonadotrophin in prepubertal ewe lambs of different Booroola genotypes. *Animal Reproduction Science*, v. 9, p. 145-151, 1985.

_____. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, v. 37, p. S11-S23, 2005.

DUFOUR, J.J. et al. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 85-94, 2000.

DUFOUR, J. Identification of the ovulating follicle by its size on different days of estrous cycle in Heifers. *Journal of Animal Science*, v. 34, p. 85-87, 1972.

DURLINGER, A. L. et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 142, p. 4891-4899, 2001.

_____. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 140, p. 5789-5796, 1999.

_____. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 143, p. 1076-1084, 2002.

ELMETWALLY, M. et al. Non-invasive colour Doppler sonography of uterine blood flow throughout pregnancy in sheep and goats. *Theriogenology*, v. 85, p. 1070–1079, 2016.

ESTIENNE, A. et al. BMP15 regulates the inhibin/activin system independently of ovulation rate control in sheep. *Society of Reproduction and Fertility*, v. 153, p. 395-404, 2017.

FANCHIN, R. et al. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable test for detecting 'poor responders' in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, v. 9, p. 1607–1611, 1994.

FIGUEIRA, L. M. et al. Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, p. 643–650, 2015.

FOGARTY, N.M. A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Ruminant Research*, v. 85, p. 75-84, 2009.

FORCADA, F. et al. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*, v.75, p.769–776, 2011.

FONSECA, J. F. et al. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v. 86, p. 144–151, 2016.

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth differentiation factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, v. 25, p. 279–283, 2000.

GIBBONS, A.E. et al. Eficiencia de um tratamento de ovulación múltiple con dosis reducida de FSHp en ovejas Merino. In: Resúmenes de las Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires. 2010.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*, v. 81, p. 112–125, 2014.

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dosage. *Theriogenology*, v. 58, p.1607–1614, 2002.

_____. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, v.60, 281–288, 2003.

_____. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p. 421–435, 2004.

GREINER, M. et al. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, p. 23-41, 2000.

GUERREIRO, B.M. et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 49, p. 96–104, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Produção da pecuária municipal, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> Acessado em 10 de maio de 2017 às 16:00.

ILHA, G.F. et al. Regulation of Anti-Müllerian Hormone and Its Receptor Expression around Follicle Deviation in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 51, p. 188-194, 2016.

IRELAND, J.J. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* v.22, p.1687-1695, 2007.

JANSSON, T. Genes involved in ovulation rate and litter size in sheep. Uppsala, 2014. Thesis (Bachelor Thesis, Animal Sciences) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences. Sweden, 2014. Disponível em: <http://stud.epsilon.slu.se/6803/7/jansson_t_140618.pdf> Acesso em: 10 de junho de 2017.

JUENGEL, J.L. et al. Effects of immunizing ewes against bone morphogenetic protein 15 on their responses to exogenous gonadotrophins to induce multiple ovulations. *Reproduction*, v. 142, p. 565-572, 2011.

LA MARCA, A.; VOLPE, A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology*, v. 64, p. 603-610, 2006.

_____. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Human Reproduction*, v. 24, p. 2264-2275, 2009.

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

_____. Influence of the FecXR Allele in Heterozygous Ewes on Follicular Population and Outcomes of IVP and ET using LOPU-Derived Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, p. 717–723, 2013.

LAMBERT-MESSERLIAN, G. Anti-Mullerian Hormone Levels for Assessing Ovarian Reserve. (AACC organization, janeiro de 2015). Disponível em: <www.aacc.org/publications/cln/articles/2015/january/the-new-egg-timer>. Acesso em: 10 de maio de 2015.

LIANG, A. et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor typeII and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*, v. 86, p. 963-970, 2016.

LIMA, F.A.M. et al. Desempenho dos ovinos deslanados no Nordeste brasileiro e planos de melhoramento para o futuro. In: Simpósio Internacional De Produção Animal, Ribeirão Preto, 1985. Anais... Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, p. 45-65, 1985.

MARTINEZ, M.F. et al. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, v. 85, p. 466-475, 2016.

MCNATTY, K.P. et al. The effects of superovulating sheep with mutations in either the activin-like kinase (Alk6) or bone morphogenetic protein (BMP15) genes on ovulation rate and embryo production. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p. S39–S43, 2006.

MENCHACA, A. et al. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v. 72, p. 477-483, 2009.

MIYAMOTO, A. et al. Potential Use of Color Ultrasound as a Tool for Reproductive Management: New Observations Using Color Ultrasound Scanning that were not Possible with Imaging Only in Black and White. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p.153–60, 2006

MONNIAUX, D. et al. L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse à une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, v. 38, p. 465-470, 2010.

_____. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction*, v.142, p.845–854, 2011.

_____. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reproduction Fertility and Development*, v.25, p.1–16, 2013

_____. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, v. 86, p. 41-53, 2016.

MONTGOMERY, G.W. et al. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*, v. 121, p. 843-852, 2001.

MOSSA, et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.95, p.2355-2361, 2012.

MULSANT P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 98, p. 5104-5109, 2001.

OLIVEIRA, M.E.F. et al. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Animal Reproduction Science*, v.144, p.30–37, 2014.

_____. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, p.29–35, 2011.

_____. Relationship of antral follicular blood flow velocity to superovulatory responses in ewes. *Animal Reproduction Science*, v. 182, p. 48–55, 2017.

PINHEIRO, J.H.T. *Parâmetros reprodutivos de ovelhas Santa Inês criadas no sertão do Ceará*. Ceará, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2004. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/joaquim_pinheiro.pdf> Acesso em: 10 de maio de 2017.

PINTO, P.H.N. et al. Repetibilidade de resposta para produção *in vivo* de embriões em ovelhas Santa Inês In: XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Santos. *Anais...* Santos: CBRA, p. 485, resumo, 2017.

PONTES, J.H.F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.

POOLE, D.H. et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granulosa cells. *Theriogenology*, v. 86, p. 1353-1360, 2016.

PRAMOD, K.R. et al. Genetics of ovulation rate in farm animals. *Veterinary World*, v. 6, p. 833-838, 2013.

RIBEIRO, E.S. et al. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 1–13, 2014.

RICO, C. et al. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 80, p. 50-59, 2009.

_____. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reproduction Fertility and Development*, v. 24, p. 932-944, 2012.

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

SANTIAGO-MORENO J. et al. Procedure for successful interspecific embryo transfer between mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Spanish Merino sheep (*Ovis Aries*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 32, p. 336–341, 2001.

SANTOS, G.M.G. et al. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Animal Reproduction Science*, v.165, p. 17–21, 2016.

SHRESTHA, J.N.B.; HEANEY, D.P. Genetic basis of variation in reproductive performance. Genetic correlation between gestation length and prolificacy in sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 23, p. 305–317, 1990.

SILVA, B.D.M. et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, v. 42, p. 89–92, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C. et al. Antral follicle populations and embryo production – in vitro and in vivo – of *Bos indicus*–*taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 228–232, 2014.

SOUZA, C.J. et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRII) gene, *Journal of Endocrinology*, v. 169, p. R1–R6, 2001.

SUITER, J. Body condition scoring of sheep and goats. *Farm Note*, v. 69, p. 1–4 1994.

TORRES-ROVIRA, L. et al. Predictive value of antral follicle count and anti-Müllerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reproduction Fertility and Development*, v.26, p.1094–1106, 2014.

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

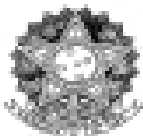
VERMA, O.P.; et al. Assisted Reproductive Techniques in Farm Animal – From Artificial Insemination to Nanobiotechnology. *Veterinary World*, v. 5, p. 301-310, 2012.

VERNUNFT, A. et al. Concentrations of anti-Muellerian-hormone in follicular fluid from antral follicles and their relation to functional characteristics of follicle development in mares. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v. 126, p.77-82, 2013.

VISSER, J.A.; THEMMEN, A.P. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Molecular Cell Endocrinology*. v. 382, p. 460–465, 2014.

ZEC, I. et al. Anti-Müllerian hormone: A unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochemia Medica*, v. 21, p. 219-230, 2011.

12. ANEXO

			
			
Serviço Público Federal Universidade Federal Fluminense Pré-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Comissão de Ética no Uso de Animais			
Certificamos que o projeto nº 699, intitulado "Desenvolvimento de novas estratégias para a otimização da produção in vivo de embriões na espécie ovina", sob a orientação do Prof. Felipe Zandonadi Brandão da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 18 de junho de 2015. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 30 (trinta) ovinos, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.			
Niterói, 18 de junho de 2015.			
			
Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli Coordenador da CEUA			