



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

AMANDA DOS SANTOS CAVALCANTI

***AVALIAÇÃO DO USO DO GnRH EM PROTOCOLOS CURTOS
DE INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO
EM OVELHAS***

**NITERÓI
2008**

AMANDA DOS SANTOS CAVALCANTI

AVALIAÇÃO DO USO DO GnRH EM PROTOCOLOS CURTOS DE
INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM
OVELHAS

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Altamiro Garcia Nogueira

Co-orientador: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

NITERÓI
2008

AVALIAÇÃO DO USO DO GnRH EM PROTOCOLOS CURTOS DE INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS

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

Aprovada em 25 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Altamiro Garcia Nogueira – Orientador
Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca – Co-orientador
Embrapa Caprinos – Núcleo Sudeste

Prof. Dr. José Antônio Silva Ribas
Instituto Biomédico - Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Eduardo Paulino da Costa
Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão
Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense

NITERÓI
2008

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Fluminense;

À minha querida mãe **Elizabeth** pelo apoio incondicional na realização deste projeto;

À minha família e amigas por sempre me apoiarem nas minhas empreitadas, em especial minha irmã caçula, **Maria**, pelas alegrias e discórdias do convívio diário;

Ao meu namorado **Marco Bernardo**, pelo companheirismo e apoio;

Ao Professor Doutor **Felipe Zandonadi Brandão**, por todo apoio e compreensão durante estes três anos de convivência, e por toda sua dedicação a esta faculdade;

Ao **Doutor Elysio Balbino**, grande amigo, e a todos os funcionários da Fazenda Jororó do Sertão, em especial o **Marcelo**, que não mediram esforços para me ajudar;

Ao Professor Doutor **Luiz Altamiro Nogueira**, que me deu esta oportunidade e sempre me incentivou na Medicina Veterinária;

Ao Doutor **Jeferson Ferreira da Fonseca** por ter me aceitado desde o início como sua “aprendiz”. Sem ele este trabalho não seria realizado!

Às minhas duas novas e grandes amigas **Mariana Boité**, pessoa maravilhosa com quem me identifiquei muito e pelos nossos infinitos “papos cabeça” e **Aline Emerim**, pela boa e agradável convivência neste período, por ser um exemplo de profissional, e por tudo que aprendi sobre éguas, sua paixão;

Às novas amigas conquistadas, **Carlinhos, Prieto, André e Bruno** pela boa companhia, bons momentos;

À Professora Dra **Nádia Almosny** e suas fiéis escudeiras **Dona Ariá, Valéria e Paula** pela dedicação a esta faculdade e por nunca me negarem ajuda;

À Professora Doutora **Tânia Góes**, o lado feminino do Departamento de Reprodução, que sempre foi um exemplo para mim;

Ao Laboratório **BET** pelas análises de progesterona;

À **Tecnopec**, pelo fornecimento dos hormônios;

Ao **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, de alguma forma, ajudaram na realização deste trabalho.

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende"*

Leonardo DaVinci

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência do GnRH em protocolos de indução e sincronização de estro em ovelhas deslanadas da raça Santa Inês e mestiças Dorper/Santa Inês e compará-los em relação às taxas de sincronização do estro, ovulação, concepção e à concentração sérica de progesterona. O experimento foi realizado no mês de janeiro, no Rio de Janeiro (22°27'S, 43°39'W). Cinquenta e quatro ovelhas da raça Santa Inês e doze mestiças Santa Inês/Dorper (n=66) foram separadas eqüitativamente em dois grupos experimentais, controle (T_{Controle}) e tratado (T_{GnRH}), de acordo com o escore de condição corporal ($3,2 \pm 0,5$) e peso ($43,8 \pm 11,1\text{Kg}$). O estro foi sincronizado com esponjas intravaginais (D0) impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona mantidas por seis dias. Vinte e quatro horas antes da retirada do pessário (D5) foram administradas 300UI de eCG via intramuscular (i.m.) e 30 μg de d-cloplorstenol via latero-vulvar subcutânea. Um dia após a retirada da esponja (D7), o T_{Controle} (n=32) recebeu 1ml de solução fisiológica e T_{GnRH} (n=34) 25 μg de GnRH i.m. Os animais de ambos os grupos foram novamente divididos para serem submetidos à monta natural controlada (n=41) ou IA laparoscópica (n=25) utilizando reprodutores de fertilidade comprovada. Para realização das coberturas as ovelhas foram rufiadas 12, 24, 36 e 48 horas após a retirada da esponja utilizando-se o próprio macho reprodutor. Foram realizadas até duas coberturas intervaladas em 24 horas. As inseminações foram realizadas sem observação de estro e com sêmen fresco 53,6 \pm 1,1 horas após a retirada da esponja. Vinte fêmeas foram selecionadas aleatoriamente, para acompanhamento da dinâmica folicular e coleta de sangue para dosagens séricas de progesterona. Os exames ultra-sonográficos foram realizados pelo mesmo operador, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a retirada da esponja. O número, a posição relativa e o tamanho dos folículos ovarianos maiores ou iguais a 3mm foram devidamente anotados. Considerou-se como dia da ovulação quando o maior folículo antes identificado, não estava mais presente. As amostras de sangue foram coletadas no dia da inserção da esponja (D0), no D4, D5, na retirada da esponja (D6) e um dia após (D7). O percentual de animais em estro (100% vs 95,2%), o intervalo entre a retirada da esponja e o estro (32,9 \pm 7,4 vs 29,8 \pm 6,9 horas), a duração do estro (37,4 \pm 9,0 vs 31,5 \pm 10,4 horas), as taxas de concepção entre os grupos de tratamento (57,0% vs 41,0%) e entre os métodos de acasalamento (55,0% vs 37,5%), a taxa de ovulação (100,0% vs 90,0%), o número médio de ovulações (1,1 \pm 0,3 vs 1,2 \pm 0,4), o diâmetro do folículo pré-ovulatório (6,4 \pm 0,6 vs 6,1 \pm 0,5 mm), o intervalo médio entre a retirada da esponja e a ovulação (59,0 \pm 3,5 vs 58,3 \pm 3,4 horas) e as concentrações séricas de progesterona em todos os momentos de coleta, não diferiram ($P > 0,05$) nos grupos T_{controle} e T_{GnRH} , respectivamente. Os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso de esponja impregnada com 60 mg de MAP por seis dias e 25 μg de GnRH associados a eCG e PGF2 α , induz e sincroniza o estro em ovelhas e que a utilização de 25 μg de GnRH 24 horas após a remoção da esponja não altera a taxa de concepção.

Palavras-chave: GnRH, sincronização e indução do estro, ovulação, ovelhas.

ABSTRACT

The goal of this study was to verify GnRH influence on estrous synchronization, ovulation, pregnancy and progesterone levels in ewes submitted to estrous synchronization with short progestagen treatment. The trial was done in January in Rio de Janeiro (22°27'S, 43°39'W). Fifty four Santa Inês and twelve Santa Inês/Dorper crossbred (n=66) ewes were equally assigned to two treatment groups, T_{control} and T_{GnRH}, according to the body condition score (3.2 ± 0.5) and weight (43.8 ± 11.1). Estrus was synchronized with vaginal sponges impregnated with 60mg Medroxyprogesterone Acetate during 6 days. A dose of 300 IU eCG i.m. and 30µg d-cloprostenol by subvulvar via were administered 24h prior to sponges withdrawal (SW). One day after SW, the control group (T_{control} n=32) received 1.0ml NaCl 0.9% solution i.m. and the treatment group (T_{GnRH} n=34) received 25µg GnRH i.m. Each group was assigned again to be half intrauterine inseminated by laparoscopic method (n=25) and the others to be natural controlled mating (n=41). Artificial insemination (AI) was performed on unchecked estrous ewes with a single dose of fresh semen applied at 53.65 ± 1.10 hours after SW. For controlled mating, oestrus was monitored at 12, 24, 36, 48 and 60 hours after SW. Two natural controlled mating were realized with 24h of interval after estrous detection. The follow up of ovarian activity was done in twenty females by real-time ultrasound image equipped with 5.0MHz linear transducer adapted to be manipulated externally in the rectum. Examinations were performed, by the same operator at 12, 24, 36, 48 and 60 hours after SW. The number, relative position and size of all follicles with a diameter ≥3mm were mapped. The day of ovulation was defined as the day when the largest follicle was no longer seen. Blood samples were collected for serum P₄ concentration on day of sponge insertion (D0), D4, D5, on day of SW (D6) and one day after SW (D7). Estrous response (100.0% vs 95.2%), average interval from SW to estrus (32.9 ± 7.4 vs 29.8 ± 6.9 h), estrous length (37.4 ± 9.0 vs 31.5 ± 10.4 hours), pregnancy rates (57,0% vs 41,0%), ovulation rate (100.0% vs 90.0%), number of ovulations/ewe (1.1 ± 0.3 vs 1.2 ± 0.4), maximum follicular diameter (6.4 ± 0.6 vs 6.1 ± 0.5 mm), average interval from SW to ovulation (59.0 ± 3.5 vs 58.3 ± 3.4 hours) and serum P₄ concentration did not differ (P>0.05) between T_{control} and T_{GnRH}, respectively. It was concluded that 25µg GnRH after short progestagens treatment associated with eCG and PGF2α induce and synchronize the estrous in ewes and that 25µg GnRH 24 hours after SW didn't change pregnancy rates in ewes.

Keywords: GnRH, estrous induction and synchronization, ovulation, ewes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM OVELHAS	15
2.1.1 Estacionalidade Reprodutiva	15
2.1.2 Ciclo Estral	18
2.1.3 Dinâmica Folicular Ovariana	22
2.1.3.1 Dinâmica Folicular Ovariana no Anestro	29
2.1.4 Corpo Lúteo: formação, estrutura, função e regressão	30
2.2 INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM OVELHAS	34
2.2.1 Efeito macho	35
2.2.2 Melatonina e Fotoperíodo Artificial	37
2.2.3 Hormônios	39
2.2.3.1 Progestágenos	39
2.2.3.2 Prostaglandina F ₂ α e seus análogos sintético	45
2.2.3.3 Gonadotrofinas	47
2.2.3.3.1 <i>Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG)</i>	48
2.2.3.3.2 <i>Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)</i>	51
2.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	55
3 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 PERÍODO EXPERIMENTAL, LOCALIZAÇÃO E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS	59
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	60
3.2.1 Ovelhas	60
3.2.2 Reprodutores	61
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	62
3.4 ACOMPANHAMENTO DA OVULAÇÃO	62
3.5 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL	63
3.6 COLETA, AVALIAÇÃO E DILUIÇÃO DO SÊMEN	64

	10
3.7 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) E COBERTURAS	65
3.7.1 Monta Natural	65
3.7.2 Inseminação Artificial	66
3.8 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	66
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 PARÂMETROS DE CONTROLE	69
4.2 PARÂMETROS DE RESULTADOS	71
4.2.1 Avaliação Ultra-sonográfica da Ovulação	71
4.2.2 Concentração Sérica de Progesterona	75
4.2.3 Detecção do Estro	78
4.2.3.1 Intervalo da retirada da esponja ao início do estro	80
4.2.3.2 Duração do estro	82
4.2.4 Taxas de concepção	83
5 CONCLUSÕES	87
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
7 ANEXOS	105
ANEXO 1 Parâmetros climatológicos avaliados durante o período do experimento	105
ANEXO 2 Parâmetros avaliados para determinação do escore da condição corporal	106
ANEXO 3 Dados das avaliações de peso e escore da condição corporal das ovelhas antes do experimento	107
ANEXO 4 Fórmula do concentrado oferecido às ovelhas	108
ANEXO 5 Composição do sal mineral oferecido às ovelhas	108
ANEXO 6 Fichas de coleta de sêmen dos carneiros e de controle da inseminação	109
ANEXO 7 Ficha para controle da ovulação	110
ANEXO 8 Fórmula do diluente utilizado para diluição do sêmen e procedimentos do preparo	111
ANEXO 9 Ficha para controle das inseminações e coberturas	112
ANEXO 10 Dosagens de progesterona (ng/ml) de todas as ovelhas	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do protocolo de indução/sincronização de estro em ovinos (R.E. – retirada da esponja). p.62

Figura 2 Perfil da concentração sérica de progesterona em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias. p.77

Figura 3 Porcentagem de animais, submetidos à monta natural, apresentando estro 12, 24, 36 e 60 horas após a retirada da esponja, bem como porcentagem de animais que não apresentaram estro nos dois grupos de tratamento. p.79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média dos parâmetros ambientais ocorridos durante o período experimental (Janeiro de 2006), p.59

Tabela 2 Ovelhas utilizadas por tratamento experimental, p.60

Tabela 3 Número de ovelhas utilizadas por tratamento, raça e local do experimento, p.61

Tabela 4 Coletas de sangue e descrição do momento do tratamento hormonal correspondente ao dia da coleta, p.63

Tabela 5 Parâmetros de controle avaliados no experimento (média \pm desvio padrão), p.70

Tabela 6 Parâmetros de resultados avaliados na ultra-sonografia de ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias, associado ou não à administração de GnRH aplicado 24 horas após a remoção da esponja (média \pm desvio padrão), p.72

Tabela 7 Dia da coleta de sangue e concentração sérica de progesterona (ng/ml) em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias (média \pm desvio padrão), p.75

Tabela 8 Intervalo em horas entre a retirada da esponja e o início do estro em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias, associado (T_{GnRH}) ou não (T_{Controle}) à administração de GnRH (média \pm d.p.), p.81

Tabela 9 Duração do estro (horas) em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias, associado ou não à administração de GnRH (média \pm d.p.), p.82

Tabela 10 Taxas de concepção através da monta natural (MN) ou inseminação artificial laparoscópica (IALP) em ovelhas da raça Santa Inês e mestiças Dorper submetidas à sincronização do estro associada (T_{GnRH}) ou não (T_{Controle}) à administração de GnRH, p.83

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR	Controlled Internal Drug Release
CL	Corpo Lúteo
DF	Diâmetro Folicular
E ₂	Estrogênio
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
FGA	Acetato de Fluorogestona
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IA	Inseminação Artificial
IALP	Inseminação Artificial Laparoscópica
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IE	Intervalo entre a retirada da esponja e o estro
IIA	Intervalo entre a retirada da esponja e a inseminação artificial
im	Via Intramuscular
IV	Via Intravenosa
LH	Hormônio Luteinizante
MN	Monta Natural
MAP	Acetato de Medroxiprogesterona
PG	Prostaglandina
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
P ₄	Progesterona
®	Marca Registrada
SNC	Sistema Nervoso Central
Sptz	Espermatozóide
Vs	<i>versus</i>
UI	Unidades Internacionais

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil, atualmente, tem grande potencial de crescimento. Embora ainda não ocupe um lugar de destaque na pecuária nacional, conta com um rebanho de 15,5 milhões de cabeças, de acordo com os dados do senso agropecuário de 2005 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Embora a região Nordeste ainda seja a de maior expressividade, com 58,44% do contingente do país, as regiões Sudeste e Centro-Oeste merecem atenção, pois apresentaram um crescimento considerável, 34,23% e 30,24%, respectivamente, de 1998 a 2005. Vale ressaltar que, neste período, o aumento do rebanho bovino nestas regiões foi de 2,48% e 21,65%. Este fato demonstra a verdadeira expansão da ovinocultura brasileira (SIMPLÍCIO; SIMPLÍCIO, 2006).

No Brasil, o consumo das carnes de caprinos e ovinos é influenciado fortemente por questões culturais. Atualmente, nos médios e grandes centros urbanos do País, observam-se novos hábitos de consumo, que têm favorecido o crescimento da demanda por produtos derivados da caprino-ovinocultura. Ressalte-se que apenas o Estado de São Paulo necessitaria hoje de um rebanho da ordem de 28 milhões de cabeças para atender a demanda por carne de cordeiro. É estratégico que se aproveite esta oportunidade disponibilizando aos usuários carnes de animais jovens, com oferta sistemática, segurança alimentar e preços competitivos (SIMPLÍCIO; SIMPLÍCIO, 2006).

Neste sentido o uso de biotécnicas da reprodução aliadas à sincronização de cio são ferramentas que facilitam o manejo e favorecem a produtividade de uma criação possibilitando a constância na oferta de lotes

homogêneos de animais e propiciando a venda de animais jovens acabados.

O objetivo do presente estudo foi avaliar dois protocolos hormonais de indução e sincronização de estro em ovelhas deslanadas da raça Santa Inês e mestiças Dorper/Santa Inês e compará-los em relação à sincronização do estro, à taxa de ovulação, ao número de ovulações, à taxa de concepção e à concentração sérica de progesterona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISILOGIA REPRODUTIVA

2.1.1 Estacionalidade Reprodutiva

Nas zonas temperadas, tanto ovinos como caprinos são animais poliéstricos estacionais (JAINUDEEN *et al.*, 2004). Esta estacionalidade é governada pelo fotoperíodo, com a atividade estral começando durante o período em que diminui a duração de luz, ou seja, nos dias curtos do outono e do inverno (SENGER, 1999; JAINUDEEN *et al.*, 2004). Tudo indica que, ao longo dos anos, a seleção natural favoreceu os partos em épocas mais apropriadas do ano, em relação ao clima e à oferta de alimentos. O anestro sazonal provavelmente se desenvolveu como um caminho para evitar a concepção nos períodos do ano em que a sobrevivência das crias fosse baixa (SENGER, 1999). Assim, parece que alguns mamíferos, principalmente as ovelhas, possuem um sistema sinalizador com uma resposta neuroendócrina apropriada à variação ambiental, assegurando que a atividade reprodutiva ocorra nas épocas mais favoráveis do ano (GORDON, 1997). A duração da estação sexual varia de acordo com a extensão do dia, com a raça e com a nutrição (JAINUDEEN *et al.*, 2004).

Sob condições naturais de luminosidade, a atividade ovariana está relacionada com a proporção diária de horas de luz:escuro. A atividade sexual começa, para diferentes raças, entre 60 e 120 dias após essa proporção

começar a diminuir (ROBERTSON, 1977). Nas zonas tropicais, onde a variação da intensidade luminosa é menor, a tendência é que ovinos e caprinos se reproduzam durante o ano todo. Logo, quando raças de zona temperada são introduzidas nos trópicos, perdem gradativamente esta estacionalidade e adquirem os padrões de reprodução característicos do novo ambiente (JAINUDEEN *et al.*, 2004). No Sudeste do Brasil, a diferença entre o maior (13h33min) e o menor (11h23min) dia do ano gira em torno de 2 horas. Enquanto que, no sul do Brasil, esta variação é de, aproximadamente, 3h50min (CORDEIRO, 1992). Segundo Traldi (2000) no Hemisfério Sul, a diferença de luminosidade entre as estações do ano é menos marcante que no Hemisfério Norte, atingindo uma luminosidade mínima de aproximadamente 10h30min de luz no dia mais curto do ano (21/06) contra 13h30min de luz (22/12) no dia mais longo do ano.

A influência do fotoperíodo é diretamente interdependente da latitude (SASA *et al.*, 2002). Em latitudes mais elevadas, a variação da intensidade luminosa é maior, assim os efeitos do fotoperíodo sobre a estacionalidade reprodutiva são mais pronunciados; enquanto que em baixas latitudes, como a diferença de horas de luz e escuro por dia é menor, o fotoperíodo tem pouco ou quase nenhum efeito sobre a atividade reprodutiva (CHAMINEAU¹ *et al.*, 1993 *apud* SASA *et al.*, 2002). Nestas condições, o anestro sazonal não ocorre ou está muito reduzido e mais relacionado às variações de disponibilidade e qualidade das forragens (CERNA *et al.*, 2000).

Como o território brasileiro se estende sobre uma grande variedade de latitudes (5°16'N a 33°45'S), as características da atividade cíclica reprodutiva de ovelhas variam consideravelmente dependendo da região (RODRIGUES *et al.*, 2007). Estes autores mostraram que no Sudeste do Brasil (21°59'S, 47°26'W), borregas das raças lanadas Romney Marsh e Suffolk apresentaram uma redução no número de períodos de estros/animal/mês na primavera e no verão, ao passo que para as fêmeas da raça deslanada Santa Inês, esta redução só foi significativa no verão e com equilibrada distribuição dos estros ao longo do ano.

Coelho *et al.* (2006) estudaram o padrão anual de liberação de

1 CHAMINEAU, P.; BERTHELOT, X.; MALPAUX, B. *et al.* La maîtrise de la reproduction par la photopériode et la mélatonine chez les mammifères d'élevage. **Cashiers Agriculture**, v.2, p.81-92, 1993.

melatonina e progesterona em quatro borregas da raça Santa Inês com $8,3 \pm 0,9$ meses de idade e $44,2 \pm 0,8$ Kg, sob fotoperíodo natural também no Sudeste do País ($21^{\circ}59'$). As coletas mensais de sangue para determinação das concentrações de melatonina, no início e no final de cada noite, confirmaram que existe um padrão de variação individual ao longo do dia, além de maior liberação de melatonina durante o outono e inverno, evidente apenas nos períodos noturnos. Realizando duas a três coletas de sangue por semana, ao longo do ano, para a determinação das concentrações plasmáticas de progesterona, os autores observaram que o padrão de secreção foi constante (>2 ng/ml), não sendo observadas diferenças entre as quatro estações: $3,24 \pm 0,18$ ng/ml na primavera; $2,72 \pm 0,19$ ng/ml no verão; $3,12 \pm 0,18$ ng/ml no outono e $3,18 \pm 0,18$ ng/ml no inverno. Estes resultados são um indicativo de que todas as fêmeas se encontravam em atividade ovulatória, durante o ano todo. Apesar das evidências dos estudos de Coelho *et al.* (2006) ainda não é possível confirmar com precisão este padrão reprodutivo, uma vez que, o mesmo foi realizado com apenas quatro animais jovens.

O modelo hipotético descrito para o controle da estacionalidade reprodutiva na ovelha considera apenas a habilidade das alterações sazonais tornarem o sistema de geração de pulsos de LH mais ou menos sensível ao *feedback* negativo do estradiol. Há, entretanto, evidências de que o fotoperíodo também exerça um efeito direto no pulso de geração de LH, independentemente da ação de esteróides (ROSA *et al.*, 2003).

A sazonalidade é regida pela transmissão da luminosidade em um sinal fisiológico através da melatonina, que é sintetizada e secretada durante as horas de escuridão, pela glândula pineal (SENGER, 1999).

A melatonina é o principal hormônio secretado pela glândula pineal. Vários estudos mostraram evidências que o padrão de secreção desse hormônio segue o ritmo circadiano, com significativa secreção ocorrendo nos períodos escuros do dia e com luz agindo como fator supressor da secreção. Conseqüentemente os níveis de melatonina, tanto na glândula pineal como no sangue, são altos à noite e baixos pela manhã. Assim, dias longos são caracterizados por um período curto de secreção de melatonina, enquanto os dias curtos são caracterizados por uma longa duração da secreção. Entretanto, já foi observado que o ritmo circadiano persiste em períodos constantes de

escuridão, sendo eliminado em períodos constantes de luminosidade (ROLLAG; NISWENDER, 1976) ou quando os animais são submetidos à pinealectomia ou à retirada do gânglio cervical superior, quando então a melatonina é secretada em quantidades pequenas ou indetectáveis (DEVESON *et al.*, 1992). Isso indica que o ritmo é gerado endogenamente, presumivelmente sob o controle do SNC (ROSA; BRYANT, 2003).

Este hormônio pode agir em diferentes níveis do sistema reprodutivo, sua principal ação parece ser no SNC. Um efeito direto da melatonina sobre o GnRH foi demonstrado por Viguié *et al.* (1995) que observaram um aumento na frequência do pulso de secreção de GnRH quando ovelhas ovariectomizadas expostas a dias longos foram tratadas com estradiol e implantes de melatonina.

A duração de cada episódio noturno de liberação é inversamente proporcional à duração do dia. O ritmo de secreção de melatonina parece servir como um sinal interno representando a duração do dia, sendo capaz de regular as variações sazonais na fisiologia e no comportamento (GOLDMAN, 1999). A diminuição da luz é captada visualmente por fotoreceptores da retina e é transmitida para o núcleo supraquiasmático do hipotálamo, seguindo para o gânglio cervical superior e para a glândula pineal. Reduzida a inibição causada pela luz, a melatonina é liberada pelos pinealócitos (SENGER, 1999) estimulando a secreção de GnRH pelo hipotálamo, o que parece ser responsável pela indução do estro na estação reprodutiva (MOBINI; *et al.*, 2002).

2.1.2 Ciclo Estral

Ciclo estral é um conjunto de eventos que se repetem sucessivamente como resultado da interação coordenada do sistema nervoso central (hipotálamo-hipófise) com o sistema reprodutivo (ovários e útero). A comunicação ocorre principalmente mediante os hormônios GnRH, LH, FSH, estradiol, progesterona e prostaglandina (GONZALEZ, 2002).

De maneira geral, o ciclo pode ser dividido em duas fases, luteal e folicular (RUBIANES, 2000a). A primeira inicia-se logo após a ovulação, num processo chamado luteinização, no qual as células da teca interna e da granulosa sofrem alterações morfoquímicas, marcadas pela intensa

angiogênese, proliferação de células fibroblásticas e hipertrofia das células luteínicas (MORAES *et al.*, 2002). A medida que a fase lútea progride, o corpo lúteo (CL) produz volume crescente de progesterona até atingir a um platô de 2 a 4ng/ml, por volta do sexto dia, que se mantém neste patamar até a luteólise 15º dia do ciclo (PANT *et al.*, 1977; ROBERTSON, 1977). Por isso, esta fase pode ser caracterizada por um ovário contendo um CL, resultante do rompimento do folículo pré-ovulatório (MORAES *et al.*, 2002). Em ovelhas, tem duração aproximada de 11 dias e se estende desde o dia dois (estro dia=0) até aproximadamente o dia 13 do ciclo. No entanto, sua duração depende de se tornar ou não gestacional (GONZALEZ, 2002).

As concentrações plasmáticas de progesterona são indetectáveis logo após a ovulação, mas começam a aumentar gradualmente a partir do 3º dia do ciclo e, na maioria das espécies, mantêm-se elevadas durante 12 dias. Em ovelhas, essas concentrações ficam em torno de 3,7ng/ml na fase luteal (GONZALEZ, 2002). Zarkawi (1997) estudou durante um ano, através de radioimunoensaio (RIA), o perfil de progesterona de 16 ovelhas da raça Awassi, em diferentes estágios reprodutivos. O autor observou que a concentração de P_4 na fase luteal variou de 5,8 a 18 nmol/l⁻¹ (11,0 ± 3,3 ng/ml) e a concentração basal antes do acasalamento variou de 0 a 1,7 nmol/L⁻¹ (0 a 0,53 ng/ml). Mukasa-Mugerwa *et al.* (1990) consideram que valores plasmáticos de P_4 superiores a 3 ng/ml caracterizam a fase de diestro (luteal) ou gestação.

A fase folicular tem duração média de dois dias, estendendo-se do dia 14 (luteólise) até o dia um (ovulação) (RUBIANES, 2000a; GONZALEZ, 2002). Esta fase, corresponde ao período pós-luteólise até a ovulação, e se caracteriza por secreção estrogênica gradualmente acelerada e alteração da mucosa uterina e vaginal. É nesta fase que o animal apresenta os sinais de estro. As concentrações plasmáticas de P_4 giram em torno de 0,25ng/ml (GONZALEZ, 2002). De acordo com Minton *et al* (1990), valores plasmáticos de P_4 inferiores a 1ng/ml podem caracterizar as fases de estro ou de anestro, sendo que no anestro as concentrações permanecem baixas por um período superior a dez dias. Segundo Mukasa-Mugerwa *et al.* (1990) concentrações persistentes de P_4 menores que 3,18 nmol l⁻¹ (1ng/ml) são indicativas de

anestro, de fase folicular ou de início da fase luteal. As concentrações basais de 0,2ng/ml possivelmente se originam do córtex da adrenal, uma vez que, concentrações similares foram encontrados em ovelhas ovariectomizadas ou em anestro (ROBERTSON, 1977).

O termo estro é usado para definir o período durante o qual a fêmea da maioria dos mamíferos aceita a cobertura do macho e o início do estro é marcado pelo momento que a fêmea aceitou a monta pela primeira vez. A maioria das raças de ovinos apresenta um intervalo médio interestros de 16,5 a 17,5 dias (ROBERTSON, 1977), alguns autores consideram que o ciclo completo tem duração de 17 ± 2 dias (RUBIANES, 2000a).

O período médio de receptividade sexual é de 24 a 30 horas, no entanto, pode ser reduzido se a cópula for realizada no início do estro (ROBERTSON, 1977). Gonzalez (2002) considera que, de forma geral, este período tem duração de 24 a 48 horas, podendo variar de acordo com a raça e a taxa de ovulação, sendo diminuído em 50% nos animais com taxas menores. Para Mobini (2002) o estro na ovelha varia de 15 a 45 horas (média de 30).

A ovulação é espontânea e ocorre cerca de 24 a 27 horas (ROBERTSON, 1977) ou 21 a 45 horas (MOBINI, 2002), após o início do estro. Este período coincide aproximadamente com 14 a 26 horas após o pico de LH (MOBINI, 2002). Ovulações duplas e triplas são comuns e ocorrem dentro de duas horas após a primeira ovulação (LINDSAY², 1991 *apud* SASA, 2002). A taxa de ovulação varia com a estação do ano, a idade e com o *status* nutricional da ovelha (ROBERTSON, 1977). O pico de prolificidade é alcançado dos quatro aos seis anos de idade, mas fêmeas com até 18 anos são capazes de levar uma gestação a termo. Sob condições nutricionais abaixo da recomendada, a fecundidade é diminuída por uma redução na taxa de ovulação (ROBERTSON, 1977).

O estro manifesta-se, basicamente, pelo efeito do estrogênio (E₂) no sistema nervoso central, a progesterona exerce um efeito sinérgico. Quando o hipotálamo é previamente exposto à progesterona, baixas concentrações de 17β-estradiol (15 pg/ml) são capazes de induzir à receptividade sexual (ROBERTSON, 1977). A seqüência da ação do E₂ para a indução do estro

² LINDSAY, D.R. Reproduction in the sheep and goat. In: CUPPS, P.T. (Ed.) **Reproduction in domestic animals**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1991. p.491-515.

deve-se a um período de elevada concentração de progesterona seguido de queda, e elevação de estradiol por 1 a 2 dias (GONZALEZ, 2002). A progesterona secretada durante a fase luteal exerce vários efeitos no ciclo estral, dentre eles, um *priming* sobre os centros comportamentais do cérebro, de forma que o comportamento de estro será induzido pelo aumento posterior dos estrógenos (RUBIANES, 2000a).

Na ovelha, a primeira ovulação na pré-puberdade ou antes de um novo período de atividade reprodutiva, não é acompanhada pelo comportamento estral. Isso porque não ocorreu a exposição prévia à progesterona, uma vez que era impúbere ou estava no anestro. A progesterona proveniente do CL desta primeira ovulação permitirá que o comportamento de estro seja manifestado, quando ocorrer o pico de estradiol na ovulação seguinte (SENGER, 1999). Boscos *et al.*, (2002) demonstraram que apenas 15,4% dos animais sem atividade ovariana prévia apresentaram estro em resposta ao tratamento progestágeno em comparação aos 52,9% dos que apresentavam atividade ovariana prévia ao tratamento.

A idade à puberdade e à primeira concepção são economicamente importantes num sistema de produção (ROBERTSON, 1977). A maioria das raças de ovelhas chega à puberdade com seis meses de idade, mas a primeira gestação não deve ocorrer antes de oito a dez meses (RUBIANES, 2000a). Nas raças e locais onde a sazonalidade é evidente, a idade à puberdade é influenciada pelo período do ano em que o animal nasce. Os animais nascidos no início da primavera irão ciclar e conceber com seis a oito meses de idade, enquanto que aqueles nascidos no final da primavera não vão ciclar até cerca de 16 meses (ROBERTSON, 1977).

Segundo Cunha e colaboradores (2002), a puberdade na espécie ovina ocorre entre seis e oito meses de idade, entretanto os autores não recomendam, para as nossas condições, cobrir as fêmeas antes que alcancem $\frac{3}{4}$ do seu peso adulto, ou seja, 60kg para as raças de grande porte (Suffolk, Ille de France e Hampshire Down), 45kg para as de médio porte (Poll Dorset, Texel e Santa Inês) e 35kg para as de menor porte (Morada Nova). O maior problema da cobertura precoce seria o aumento da mortalidade das crias devido à incapacidade da fêmea em manter a gestação, à menor produção de leite, à maior probabilidade de rejeição por imaturidade da fêmea, além do

comprometimento do crescimento da matriz. Num estudo comparando a influência de diferentes níveis energéticos na dieta sobre idade e peso à puberdade, em borregas da raça Morada Nova no Nordeste do Brasil, Johnson *et al.* (1988) observaram que, quando alimentadas durante a fase de crescimento, as borregas alcançam peso de 18-22kg aos 260-320 dias de idade e expressam comportamento de estro se expostas aos machos.

Num estudo com 72 fêmeas deslanadas na mesma região, Silva *et al.* (1988) observaram que idade e peso à puberdade para os ovinos das raças Morada Nova, Somalis brasileira e Santa Inês, na pastagem nativa, foram de 306,9 dias-23,2 kg; 346,0 dias-19,3 kg e 360,0 dias-27,1 kg, respectivamente. No confinamento estes valores foram de 250,7 dias-23,8 kg; 268,4 dias-23,7 kg e 277,8 dias-34,2 kg. Assim, eles concluíram que o manejo nutricional influencia a idade ($P < 0,05$) e o peso ($P < 0,001$) em que os animais entram na puberdade.

2.1.3 Dinâmica Folicular Ovariana

Antes do uso da ultra-sonografia para o estudo do ciclo estral em pequenos ruminantes, alguns autores consideravam que não parecia haver nenhuma relação entre o número de folículos e o estágio do ciclo estral (KAMMLADE³ *et al.*, 1952 *apud* EVANS 2003b). Com o desenvolvimento da ultra-sonografia como uma ferramenta não invasiva para monitorar o crescimento e regressão dos folículos ovarianos e do CL (PIERSON; GINTHER, 1984), pôde-se afirmar que os folículos ovarianos crescem em grupos num padrão de ondas durante o ciclo estral em bovinos (SIROIS; FORTUNE 1988). Mais tarde, este achado se estendeu a outras espécies (EVANS, 2003b). Assim, com a introdução do uso da ultra-sonografia transretal como instrumento do estudo da fisiologia ovariana, permitiu-se a obtenção de informações sobre a dinâmica folicular durante o ciclo estral e anestro sazonal e sobre o desenvolvimento de ondas foliculares em muitas espécies (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Bartlewski *et al.* (2002) demonstraram que a ultra-sonografia transretal é uma ferramenta útil no estudo da função ovariana

3 KAMMLADE WG, WELCH JA, NALBANDOV AV, NORTON HW, Pituitary activity of sheep in relation to the breeding season. *Journal of Animal Science* 11, 646-655, 1952:

de ovelhas a partir de quatro semanas de idade.

Durante o ciclo estral ocorre uma cadeia de eventos que se repetem sucessivamente até o impedimento da luteólise pela gestação (ou no anestro fisiológico, no caso das ovelhas). Na ovelha o processo de foliculogênese tem início na fase fetal, com a formação de um *pool* de folículos primordiais, que vão se desenvolver ao longo da vida reprodutiva da fêmea (MORAES *et al.*, 2002). Estima-se que ao nascimento haja em torno de 100 a 200 mil folículos primordiais. Esse *pool* não é renovável e durante a vida do animal se desenvolvem em folículos primários, secundários e terciários (antral), antes da ovulação (EVANS, 2003b).

Independente do estágio fisiológico, os ovários da maioria dos animais de produção contém um grande estoque de folículos primordiais, e uma população mais limitada de folículos pré-antrais (100 a 1000) e antrais (50 a 300). O tempo requerido para o crescimento dos folículos primordiais e pré-antrais à ovulação é de meses e semanas, respectivamente (DRIANCOURT, 2001). Na ovelha adulta, o tempo para que um folículo evolua até o estágio antral foi estimado em 130 dias (CAHILL⁴, 1981 *apud* MORAES *et al.*, 2002). A maioria destes folículos durante o crescimento vão se degenerar no processo conhecido por atresia folicular, enquanto, apenas uma minoria irá completar a maturação e ovular (MORAES, 2002).

Nos pequenos ruminantes o desenvolvimento folicular ocorre em ondas (RUBIANES, 2000a; EVANS, 2003b; MENCHACA; RUBIANES, 2004). Esta afirmação foi comprovada por Evans *et al.* (2000) em experimento avaliando diariamente, por ultra-sonografia, o número de folículos pequenos, médios e grandes de um total de 31 ciclos estrais. Os autores observaram o aumento significativo no número de folículos a intervalos regulares. Evans (2003b) considerou que uma onda folicular é caracterizada pelo crescimento sincrônico de um grupo de folículos semelhantes, de onde um (ou mais, dependendo da espécie) continuará o crescimento enquanto outros irão regredir em intervalos variáveis.

De maneira geral, em uma onda folicular, três eventos são morfo e fisiologicamente caracterizados: emergência, desvio e dominância (GINTHER

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

et al., 1996). A emergência é o início de uma onda folicular e é marcada pelo crescimento sincrônico de diversos pequenos folículos (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Para Evans (2003b), o dia da emergência da onda é o primeiro dia da onda folicular em que um grupo de folículos pode ser detectado através de ultra-sonografia. O termo “recrutamento folicular” é frequentemente utilizado como sinônimo de emergência (GINTHER *et al.*, 1996) mas, é melhor definido como o crescimento de folículos que tenham se tornado dependentes de gonadotropinas (DRIANCOURT, 2001). Desvio folicular é o processo que resulta na diminuição do número de folículos crescentes numa onda, pelo processo de regressão, até um número espécie-específico - de folículos que irão ovular. Este processo ocorre por um período determinado de tempo e acaba quando o folículo dominante é selecionado, o que é visto pela diferença no tamanho dos folículos (EVANS, 2003b). Este momento é referido como desvio, pois há uma divergência na taxa de crescimento (GINTHER, *et al.*, 1996) e folículo dominante continua o seu crescimento enquanto o crescimento e desenvolvimento dos outros folículos é inibido. Os folículos subordinados são aqueles restantes que regridem na presença de um folículo dominante (EVANS, 2003b).

A qualquer momento pode haver cerca de 50 folículos antrais nos ovários de um ovelha adulta, com três a seis folículos com mais de 2 mm de diâmetro detectáveis através da ultra-sonografia. Nesta espécie, o recrutamento folicular normalmente ocorre quando os folículos medem cerca de 2 a 3 mm (EVANS *et al.*, 2000). Ao passo que, de acordo com Ginther *et al* (1995), Bartlewski *et al* (1999) o folículo dominante e o maior folículo subordinado alcançam diâmetro máximo de 5–7 e 3–5 mm, respectivamente.

De acordo com diferentes autores (BARTLEWSKI *et al.*, 1999; VIÑOLES *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2000) o número de ondas por ciclo varia de duas a quatro, sendo que o padrão mais encontrado em ovelhas é o de três (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Estas emergem em intervalos de quatro a seis dias, tanto na estação reprodutiva como durante o anestro estacional (RUBIANES, 2000a; MENCHACA; RUBIANES, 2004). O dia da emergência de cada onda varia com o número de ondas por ciclo e é muito difícil determinar exatamente este momento, exceto o dia da primeira onda que, ocorre por volta do dia da ovulação (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Avaliando diariamente

por ultra-sonografia o número de folículos pequenos, médios e grandes de um total de 31 ciclos estrais, Evans *et al.* (2000) observaram a ocorrência de dez ciclos com 2 ondas, vinte com 3 e apenas um ciclo com 4 ondas. Estes ciclos estrais apresentaram duração de $15,6 \pm 1,6$, $16,1 \pm 1,1$ e 17 dias, respectivamente, mostrando que a duração do ciclo depende do número de ondas foliculares. Entretanto, Leyva *et al.* (1998) não observaram diferenças na duração do ciclo estral ($16,5 \pm 0,2$ dias) entre ovelhas sincronizadas para explicar a diferença no número de ondas foliculares, e atribuíram este achado à individualidades da raça utilizada e ao tratamento com hormônios exógenos. Evans *et al.* (2000) traçaram o perfil de um ciclo com duas e três ondas de crescimento folicular. No ciclo de duas ondas o número de folículos emergindo foi maior e a emergência ocorreu nos dias 1 e 9 do ciclo, ao passo que no de três ondas ocorreu nos dias 3, 7 e 12. Ademais, o segundo maior folículo da onda emergiu concomitante ao folículo dominante em ambos os ciclos. O diâmetro máximo alcançado foi semelhante nos dois ciclos ($6.5 \pm 0.2\text{mm}$ e $6.5 \pm 0.1\text{mm}$).

As gonadotrofinas hipofisárias, FSH e LH, atuam na manifestação, manutenção e suspensão dos três eventos de uma onda folicular. O FSH determina a emergência das ondas, uma vez que, uma elevação nas suas concentrações é observada um a dois dias antes de cada onda (GINTHER *et al.*, 1995). A seleção do folículo dominante permite que ocorra um *feed-back* positivo com o eixo hipotálamo-hipófise culminando na ovulação (MENCHACA; RUBIANES 2002). Do ponto de vista hormonal são relatados quatro estágios de acordo com a atividade hormonal predominante: gonadotrofina independente, FSH dependente correspondente à fase de recrutamento, FSH e LH dependente e LH dependente (GINTHER *et al.* 1996). Scaramuzzi *et al.* (1993) sugeriram um modelo funcional de crescimento folicular na espécie ovina, que se dividiu em cinco grupos baseado na dependência ou sensibilidade dos folículos à gonadotrofinas.

O primeiro grupo é dos folículos primordiais, que são pequenos e estão presentes em grande número nos ovários (40.000-300.000). Estes folículos medem aproximadamente 0,03 mm e os seus oócitos são livres da zona pelúcida. Eles não possuem receptores nem para FSH e nem para LH. Também não possuem atividade aromatase (SOUZA *et al.*,1997). O

crescimento de folículos primordiais em primários parece ser independente das gonadotrofinas porém há indícios de que ocorra a participação de fatores de crescimento. Os folículos primordiais não têm suprimento sanguíneo próprio e, dessa forma recebem nutrientes por difusão. Neste desenvolvimento, as células da granulosa crescem e se multiplicam e uma vez iniciado o desenvolvimento (diz-se folículos ativados), os folículos estão comprometidos a crescer, resultando em atresia ou ovulação (MORAES *et al.*, 2002).

O segundo grupo é o dos folículos primários, aproximadamente 4.000. Estes ainda não são dependentes de gonadotrofinas, mas os ovócitos já estão sendo envolvidos pela zona pelúcida. Possuem tamanho de 0,03 a 0,1mm e receptores para FSH podem ser identificados nas células da granulosa e as células da teca já possuem receptores para LH (SOUZA *et al.*,1997). Provavelmente, a interação de diversos fatores de crescimento seja responsável pelo recrutamento do folículo primordial até a expressão de RNAm para receptores de FSH e consequente dependência de gonadotrofinas para continuar seu desenvolvimento.

O terceiro grupo, é o do folículos responsivos à gonadotrofinas, de aproximadamente 25 folículos (SOUZA *et al.*,1997). Na ovelha os folículos responsivos à gonadotrofinas variam entre 0,1 e 2,5mm de diâmetro e são conhecidos como folículos pré-antrais tardios ou pequenos folículos antrais. Eles possuem receptores de FSH nas células da granulosa e receptores de LH nas células da teca, entretanto, o suporte de gonadotrofinas não é essencial para seu desenvolvimento (Mc NATTY *et al.*, 1990). Neste período ocorre um rápido crescimento folicular e uma taxa máxima de proliferação das células da granulosa. A ativação da aromatase é um passo crucial no desenvolvimento folicular, entretanto, uma quantia significativa de estradiol não é detectada antes do folículo alcançar 0,5mm (SOUZA *et al.*,1997).

O quarto grupo é o dos folículos dependentes de gonadotrofinas, nesta fase ocorre a seleção. Estes estão em menor número (1-8 folículos). O requerimento de gonadotrofinas para o crescimento folicular se inicia a partir de folículos com diâmetro acima de 2,5mm. Primeiramente este desenvolvimento é dependente de FSH, uma vez que, apenas o FSH é capaz de estimular o desenvolvimento folicular (CAMPBELL *et al.*, 1995). Essa dependência de FSH também torna esta classe de folículos particularmente susceptível à atresia

(SCARAMUZZI, *et al.*, 1993). Quando o folículo selecionado aumenta de tamanho, paralelamente aumenta a produção de estradiol, androstenediona e inibina, que reduz a concentração de FSH (SOUZA *et al.*, 1997). Receptores para LH desenvolvem-se nas células da granulosa e da teca deste folículo e esses são induzidos pela ação combinada do estradiol e o FSH.

O quinto e último grupo é o dos folículos ovulatórios, que medem de 2,5 a 6,0mm; encontram-se de 1 a 2 folículos nesta fase, também conhecida como fase de dominância. Os folículos ovulatórios possuem um grande número de receptores de FSH e de LH e a sua atividade aromatase é máxima, aumentando a concentração de estradiol intra-folicular. O folículo ovulatório é responsável por 90% do estradiol circulante, fator crucial para a continuação do seu desenvolvimento (VIÑOLES, 2003).

Há evidências de que o maior folículo da onda inibe o desenvolvimento dos outros folículos. Gonzalez-Bulnes *et al.*, (2004) estudaram a atividade endócrina em oito ovelhas Scottish Blackface. Os autores aplicaram doses endovenosas de 2µg de LH a cada 90 minutos durante 14 dias. Neste período realizaram exames ultra-sonográficos diariamente e coletaram sangue a cada 12 horas para dosagem plasmática de FSH, LH, inibina e estradiol. Foi observado que a presença de folículos grandes coincidiu com a baixa amplitude e alta frequência (2µg a cada 90 minutos) nos pulsos de LH e inibiu o crescimento de outros folículos presentes no ovário. Essa inibição ocorre, principalmente, por fatores sistêmicos, pois o crescimento do maior folículo está relacionado com uma diminuição das concentrações de FSH e, conseqüentemente, com o número de folículos em ambos os ovários.

Entretanto, os autores mostraram duas evidências que suportam a hipótese de que pode haver alguma influência do folículo dominante no interior do ovário: (a) embora tivesse um número semelhante de novos folículos crescendo em ambos os ovários, este fato foi mais fortemente suprimido no ovário contendo o folículo dominante; (b) exceto em uma ovelha, a emergência de novos folículos grandes sempre ocorreu no ovário contralateral aquele que já continha um folículo grande. O estudo mostrou uma diminuição no número de pequenos folículos crescendo no ovário ipsilateral ao do folículo dominante e a maioria dos folículos médios se desenvolvendo no ovário contralateral ao do maior folículo, resultado que sugere que a dominância sistêmica causada

por baixas concentrações de FSH é incrementada por uma interação intraovariana entre os folículos.

Os autores consideraram então, que o mecanismo de dominância em ovelhas é diferente daquele observado em vacas, no qual o folículo dominante inibe o crescimento de outros folículos. Em ovelhas parece que o surgimento de novos folículos está diminuído, mas não inibido, embora o seu desenvolvimento subsequente esteja suprimido.

Rubianes e Menchaca (2006), realizaram um tratamento superestimulatório com FSH em ovelhas, dividido em seis aplicações iguais a cada 12 horas, tendo início no momento da emergência da primeira onda de crescimento folicular (imediatamente após a ovulação) ou três dias mais tarde (i.e. na ausência ou presença do maior folículo, respectivamente). Todos os animais foram avaliados, por meio da ultra-sonografia transretal duas vezes ao dia, quanto ao número total de folículos iguais ou maiores do que 3 mm. O recrutamento folicular promovido pelo FSH foi afetado pela presença do maior folículo em fase de crescimento no momento em que se iniciou o tratamento (i.e. ovelhas tratadas no dia 3). Nas ovelhas tratadas no dia 0, o FSH promoveu um aumento da população de folículos grandes nas 48, 72 e 96 horas posteriores. Em contraste, a presença de um folículo grande no início do tratamento (ovelhas tratadas no dia 3) reduziu o número de folículos recrutados, sendo este fato atribuído ao efeito inibitório da presença de um folículo grande (dominante).

Flynn *et al.* (2000) verificaram que entre os dias 16 e 20 do ciclo estral havia menos folículos de tamanho médio no ovário quando um folículo maior estava presente por maior tempo e sugeriram que um folículo dominante com meia vida prolongada inibe o crescimento de outros folículos no ovário, suportando o conceito de dominância em ovelhas.

Evans *et al.* (2000) também observaram evidências que sustentam o conceito de dominância em ovelhas. Inicialmente acompanharam 31 ciclos e em cada onda havia sempre um folículo significativamente maior. Desses 31 ciclos observaram apenas duas ovulações duplas, além disso, os folículos da onda ovulatória só emergiram no final da fase estática do maior folículo da onda anterior, ou seja, no período entre o final da fase de crescimento e o início da fase de regressão. Em um segundo experimento realizaram ovariectomia

em seis animais no dia 5 do ciclo (D5) e em cinco animais no dia 14 do ciclo (D14) obtendo ao final um total de 84 folículos dissecados para avaliar diâmetro e concentração de estradiol e progesterona. Neste estudo, a média das concentrações de estradiol de um folículo das ondas um (D5) e três (D14) foi maior ou tendeu a ser maior e a razão estradiol:progesterona foi maior do que nos outros folículos da onda, mostrando que numa onda folicular há uma hierarquia entre os folículos no que diz respeito ao diâmetro folicular e à concentração de esteróides do fluido folicular.

Entretanto, Johnson *et al.* (1996) avaliaram o desenvolvimento folicular diariamente a partir do quarto dia do ciclo estral em ovelhas e observaram que um folículo relativamente jovem é capaz de aumentar seu tamanho e, eventualmente ovular na presença de um folículo ovulatório mais velho, não suportando o suposto efeito inibitório de um folículo pré-ovulatório sobre o crescimento de outros folículos menores. Para Flynn *et al.* (2000), a dominância dos folículos ovulatórios nesta espécie ainda é questionável.

O crescimento e atresia dos folículos continua até cerca de 60 dias de gestação, quando folículos de 5mm ainda podem ser identificados (ROBERTSON, 1977).

2.1.3.1 Dinâmica Folicular Ovariana no Anestro

A dinâmica folicular e o perfil hormonal no anestro foram determinados por Bartlewski *et al.* (1998), através do acompanhamento ultra-sonográfico de 4 períodos de 17 dias, em doze ovelhas Western White-faced.

Os autores mostraram que os ovários se mantêm ativos durante esta fase e que o maior folículo antral alcança tamanho pré-ovulatório (≥ 5 mm de diâmetro) em todos os estágios do anestro. O número de folículos antrais grandes (≥ 5 mm) não difere ao longo do anestro, apresentando o tamanho e duração médios de $5,9 \pm 0,3$ mm e $7,7 \pm 0,9$ dias, respectivamente. Além disso, esses folículos exibem um padrão de desenvolvimento em ondas, com média de $2,8 \pm 0,1$ ondas a cada 17 dias, intervalo de emergência entre ondas de $4,6 \pm 0,5$ dias e $1,2 \pm 0,1$ folículos por onda. Esse padrão rítmico de emergência folicular foi associado ao aumento nas concentrações plasmáticas de FSH, que ocorreram um dia antes, um dia depois ou no dia da emergência da onda.

Adicionalmente, a frequência dos pulsos de LH não diferiu durante todo anestro; a produção de progesterona foi suprimida e, embora alguns animais tenham apresentado aumentos esporádicos nas concentrações plasmáticas deste hormônio, o aumento foi randomizado e não associado com ovulações ou luteinização de estruturas ovarianas. As concentrações de estradiol se mantiveram relativamente baixas ao longo de todo período anovulatório. Segundo Yuthasastrakosol⁵ *et al.* 1975, *apud* BARTLEWSKI *et al.*, 1998) em ovelhas em anestro, mesmo que os folículos cresçam até o tamanho pré-ovulatório, a produção de estrógeno é menor do que durante a estação reprodutiva.

Com este estudo os autores puderam mostrar que, em ovelhas em anestro, o crescimento de folículos antrais até tamanho ovulatório é mantido, há uma mudança transitória no número de folículos pequenos e médios no meio do anestro, e que a emergência das ondas ocorre em sincronia com o aumento da concentração plasmática de FSH.

Durante o anestro sazonal, folículos de 5mm podem ser ocasionalmente encontrados. Em ovelhas maduras a quiescência folicular, e portanto a ovariana, pode ser relativa à raça, presença ou ausência do macho e ao ambiente (ROBERTSON, 1977).

2.1.5 Corpo Lúteo: formação, estrutura, função e regressão

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina transitória, formada pela parede do folículo de Graaf após a liberação do oócito, por um complexo mecanismo envolvendo mudanças morfofisiológicas e bioquímicas (MILVAE *et al.*, 1996; SANGHA *et al.*, 2002). Apresenta variações em tamanho, estrutura e atividades esteroideogênicas em diferentes estágios do ciclo estral e prenhez (FIELDS; FIELDS, 1996).

Nas fêmeas domésticas unculadas (vaca, ovelha, cabra, porca e égua) o CL é o suporte essencial de progesterona no primeiro trimestre de gestação (SILVIA, 1999). Tem como principal função a secreção de progesterona, e em menores quantidades também secreta 17 beta estradiol, prostaglandinas (PG)

⁵ YUTHASASTRAKOSOL, P., PALMER, W.M., HOWLAND, B.E. Luteinizing hormone, oestrogen and progesterone levels in peripheral serum of anoestrous and cyclic ewes as determined by radioimmunoassay. *Journal of Reproduction and Fertility*, 43, 57-65, 1975.

e hormônios peptídeos como a relaxina, ocitocina, neuropressina I, vasopressina e inibina (FIELDS⁶, 1991 *apud* SANGHA *et al.*, 2002).

A funcionalidade do CL dos ruminantes (medida pela secreção de progesterona) é regulada pelo LH proveniente da hipófise anterior. Após a ligação de LH ao seu receptor, ocorre a ativação da adenil ciclase e o subsequente aumento das concentrações de cAMP. A presença de cAMP estimula a esteroidogênese em poucos minutos, facilitando o transporte de colesterol para dentro da célula e do meio intracelular para dentro da mitocôndria, que converte o colesterol em pregnenolona pela ação da enzima clivadora de cadeia lateral, localizada na membrana interna da mitocôndria. A ação do LH (via cAMP) é de aumentar a concentração das enzimas esteroidogênicas (MORAES, 2002).

Concentrações basais de P₄ de 0.2 ng/ml são provenientes do cortex da adrenal, visto que, concentrações similares foram observadas em ovelhas ovariectomizadas e ovelhas intactas em anestro. Um aumento evidente nas concentrações plasmáticas ocorre por volta do dia 4 do ciclo, alcançando um platô de 2 a 4 ng/ml no dia 7, então declina rapidamente no dia 15, cerca de 36 horas antes do início do período seguinte de receptividade sexual. (ROBERTSON, 1977).

O desenvolvimento normal do CL e sua capacidade de produzir progesterona, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas são dependentes da vascularização (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). A inadequada vascularização luteal, é a causa primária da disfunção luteal (DUGGAVATHI *et al.*, 2003).

Após a ovulação o suprimento sanguíneo das células da granulosa aumenta. Essas células crescem e se dividem formando um corpo sólido que alcança seu tamanho máximo e sua completa atividade funcional por volta do sétimo dia após a ovulação. Neste momento o CL está altamente vascularizado, recebendo aproximadamente 97% do fluxo de sangue ovariano (ROBERTSON, 1977). O diâmetro máximo do CL da ovelha é alcançado 6 a 9 dias após a ovulação e sua regressão começa entre o dia 13 e 16 do ciclo (JABLONKA-SHARIFF *et al.*, 1993).

6 FIELDS, P.A. 1991 Relaxin and other luteal peptides: cell localization and function in the ovary. In: Familiari, G.; Makabe, S.; Motta, P.M. (Eds) Ultrastructure of the Ovary . Kluwer Academic Press, Boston, pp.177-198.

Estão presentes dois tipos de células esteroidogênicas no CL, a célula luteal pequena e a célula luteal grande, derivadas da teca interna e da granulosa do folículo ovulatório, respectivamente. Nos estágios finais, as células luteais grandes também são originadas a partir das pequenas (MILVAE *et al.*, 1996).

Na ovelha, a célula lútea pequena tem cerca de 16-18 μ m de tamanho e corresponde a 18-23% do volume total do CL e a 23-26% do número total de células lúteas; já a célula luteal grande, apresenta 26-31 μ m de tamanho e corresponde a 33-38% do volume total e 8-14% do número total de células lúteas (SANGHA *et al.* 2002). Ambas parecem sofrer aumento de diâmetro a medida que o ciclo progride (MILVAE *et al.*, 1996).

Entretanto, estas células não diferem apenas em tamanho e características ultraestruturais, mas também na sua capacidade esteroidogênica e na responsividade aos estímulos. Em geral, as células pequenas são mais responsivas aos efeitos estimulatórios do LH, enquanto as células grandes parecem ser mais sensíveis aos efeitos luteolíticos da PGF₂ α . Embora as células pequenas respondam a várias prostaglandinas, a produção de progesterona é mais estimulada do que suprimida nestas células. Considerando que estas duas células esteroidogênicas são funcionalmente distintas, é razoável que ocorra uma interação entre elas durante o estímulo do LH ou a inibição da PG (PATE, 1996).

Essa comunicação intercelular ocorre em dois sentidos. Os sinais podem ser transmitidos entre células, via transferência direta dos conteúdos celulares, como a transferência de moléculas mensageiras intracelulares através das junções *GAP*, agindo como um amplificador de um sinal hormonal inicial. Ou, a interação entre as células pode ser via secreção de mediadores parácrinos, como prostaglandinas, peptídeos, fatores de crescimento e esteróides, que agem sobre diversas células “vizinhas” simultaneamente (PATE, 1996).

A interação exata entre as células lúteas grandes e pequenas ainda não está clara, mas sabe-se que as células pequenas são mais responsivas ao LH e este efeito do LH vai resultar num efeito positivo das células pequenas sobre a esteroidogênese das células grandes. Similarmente, o efeito da PG sobre as células grandes vai desencadear um efeito inibitório destas sobre as pequenas

(PATE, 1996).

Também se observam células não esteroidogênicas, que são as células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e leucócitos (SHARMA; SHARMA, 1998). As células não esteroidogênicas, detentoras de importante papel na função luteal, representam cerca de 14% do volume do CL e 53% do contingente luteal em bovinos (FIELDS; FIELDS, 1996). Entretanto, a composição celular do CL varia ao longo da duração do CL e sempre há mais células não esteroidogênicas do que esteroidogênicas (PATE, 1996).

A luteólise ocorre devido a uma série de interações endócrinas envolvendo o útero, ovários e possivelmente a neuro-hipófise. A $PGF2\alpha$ secretada pelo útero, induz à luteólise. Os hormônios P_4 , E_2 e ocitocina, interagem na regulação da secreção de $PGF2\alpha$ pelo útero (SILVIA, 1999). A $PGF2\alpha$ induz a uma rápida exocitose com secreção de grânulos, e em ruminantes um dos componentes desses grânulos é a ocitocina (THEODOSIS *et al.*, 1986). A outra ação da $PGF2\alpha$ é de fazer sua própria síntese em células luteais bovinas *in vitro*. Isto talvez seja devido a habilidade de induzir a produção de PGH sintetase-2, enzima que inicia a conversão de ácido aracdônico em $PGF2\alpha$ (TSAI; WILTBANK, 1997). Então, a $PGF2\alpha$ talvez contribua na luteólise por aumentar a sua síntese no interior do CL (SILVIA, 1999).

Aproximadamente 13-14 dias após do estro, o endométrio desenvolve a capacidade de secretar a $PGF2\alpha$ em resposta à ocitocina (SILVIA *et al.*, 1992). A síntese de receptores de ocitocina no útero parece ser controlada pelos hormônios esteróides ovarianos, progesterona e estrogênio. O útero é exposto a estes hormônios por aproximadamente 10 dias, antes de tornar-se responsivo à ocitocina (HOMANICS; SILVIA, 1988).

O discreto pulso de ocitocina liberado pela neuro-hipófise, induz a secreção de $PGF2\alpha$ pelo útero. Esta $PGF2\alpha$ pode então agir no CL, promovendo a secreção de ocitocina luteal, ativando um *feedback* positivo existente entre a $PGF2\alpha$ uterina e a ocitocina luteal (FLINT *et al.*, 1986). A ativação deste *feedback* ocorre pelo sincronismo natural de $PGF2\alpha$ e os pulsos de ocitocina durante a luteólise.

Os efeitos da progesterona nos receptores de ocitocina são complexos. Vallet *et al.*, (1990) verificaram que em ovelhas ovariectomizadas depois de 10

dias de exposição à progesterona exógena, as concentrações de receptores de ocitocina começam a aumentar. O tempo desta resposta à progesterona é dependente da exposição anterior do útero a uma seqüência apropriada de progesterona seguida de estradiol. Esta seqüência de exposição ao esteróide representa o final da fase luteal e a subsequente fase folicular (SILVIA, 1999). Se o útero não foi sensibilizado pela progesterona e estradiol no ciclo anterior, a secreção uterina de ocitocina desenvolve-se prematuramente. Esta é a base endócrina da regressão prematura do CL, que é muito comum em ovelhas que iniciam o ciclo estral após o anestro sazonal (HUNTER *et al.*, 1986).

A duração da fase luteal em ovinos pode ser alterada, levando, por conseqüência, à diminuição ou aumento do ciclo estral. Ciclos estrais longos são mais comuns no final da estação de acasalamento. Já os ciclos curtos concentram-se na estação de transição e início da estação de acasalamento. A regressão luteal precoce é um fenômeno comum em ovelhas (SCHIEWE *et al.*, 1990). Este fenômeno é exacerbado em ovelhas superovuladas e está associado a baixas concentrações de progesterona entre o terceiro e sexto dia do ciclo estral (estro=dia 0) e à deflagração precoce da cascata luteolítica (LASSOUED *et al.*, 1997). A regressão luteal precoce é evidente cerca de quatro dias após o estro, mas as concentrações plasmáticas de progesterona incompatíveis com atividade luteal normal já são detectadas aos três dias após o estro (SAHARREA *et al.*, 1998).

2.2 INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM OVELHAS

As limitações para a detecção do estro têm estimulado os pesquisadores a empregarem drogas para induzi-lo em períodos pré-determinados. Nesse sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas para viabilizar ainda mais a inseminação artificial (IA). Essas novas metodologias envolvem a utilização de protocolos hormonais para sincronizar não somente o estro, mas também a onda folicular (PORTO FILHO, 2004).

A sincronização de estro em bovinos e ovinos é uma biotécnica reprodutiva que permite a concentração da inseminação e da parição em épocas desejáveis dentro dos sistemas de produção (EVANS; MAXWELL, 1987). Em programas de reprodução assistida, o principal objetivo é conseguir

sincronizar o momento da ovulação e trabalhar com inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Protocolos de sincronização que permitam a IATF em ovelhas são úteis, uma vez que, a detecção do estro não é prática (LUTHER *et al.*, 2007). De acordo com Driancourt (2001), protocolos eficientes para sincronizar a ovulação devem induzir a atresia de folículos grandes presentes nos ovários, proporcionando o desenvolvimento de uma nova onda de crescimento folicular, desenvolvimento sincronizado de um novo folículo dominante em todas as fêmeas e ovulação em horário previsível.

É importante observar a diferença entre indução e sincronização de estro. Segundo Rubianes (2000b), o conceito de indução de estro implica no desencadeamento de uma fase folicular que, associada ao comportamento estral, culmina com a ovulação. Este conceito pode ser utilizado para animais em anestro. Para Moraes *et al.* (2002), a indução de estro consiste em induzir a ciclicidade de animais em anestro, através da utilização de hormônios ou práticas de manejo. A sincronização do estro, por sua vez, refere-se à simultaneidade desses eventos induzidos em um conjunto de animais tratados (RUBIANES, 2000b). Assim, a sincronização consiste em encurtar ou prolongar o ciclo estral através da utilização de hormônios ou associações hormonais de maneira que um grupo de animais entre em estro ou ovule durante um curto período de tempo ou, até mesmo, num único dia (MORAES *et al.*, 2002).

Existem diversos métodos de indução e/ou sincronização de estro em pequenos ruminantes, quais sejam: efeito macho (LUCIDI, 2001; MARTIN *et al.*, 2004) indução hormonal através de implante de melatonina (TRALDI, 2000), utilização do fotoperíodo artificial (CORDEIRO, 1992; MOBINI, 2002), uso de pessários vaginais de progesterona associados à injeção de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (GORDON, 1997; TAKADA, 2004) e uso de prostaglandinas (RUBIANES *et al.*, 2003).

2.2.1 Efeito macho

O chamado “efeito macho” consiste na introdução repentina de machos no lote de fêmeas em anestro, desta forma estimula o desenvolvimento folicular, a esteroidogênese e a ovulação (BARTLEWSKI *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2004). Gordon (1997), relata que a introdução de machos nas últimas

semanas do período de anestro pode estimular a ovulação dentro de 2- 3 dias, sem acompanhamento do comportamento estral, que só irá ocorrer cerca de três semanas depois da exposição. Para Robinson (1977) com a introdução do macho a ovulação silenciosa ocorre dentro de 6 dias e o estro 16-17 dias após. Assim, ovelhas em anestro isoladas respondem à reintrodução do macho exibindo estro em um período relativamente sincronizado equivalente a cerca de um ou dois ciclos estrais após o contato. Rosa *et al.*, (2003) expuseram 250 ovelhas, previamente isoladas por três meses, ao macho durante um mês e observaram que o intervalo médio entre a introdução do macho e o estro foi de $23,1 \pm 0,16$ dias, com uma concentração compacta dos estros (87,3%) ocorrendo entre 21 e 25 dias após a introdução do macho. No referido experimento a taxa de gestação foi de 85,4%.

De acordo com alguns estudos coletados por Gordon (1997) parece que os machos não precisam ter contato visual ou físico com as fêmeas e que, os ferormônios produzidos pelos carneiros estão presentes no pelo/lã ou na suarda e podem estimular a atividade reprodutiva de ovelhas. Robertson (1977) relata que apenas o estímulo olfatório ou o auditivo é suficiente. As células secretoras de GnRH, cruciais para o início do comportamento sexual, parecem estar localizadas no hipotálamo mediobasal (BOUKHIQ *et al.*, 1999), mas ainda se sabe pouco sobre como os sinais olfatórios e visuais provocados pelos machos alcançam esta região (MARTIN *et al.*, 2004).

Bartlewski *et al.* (2002) acompanharam o desenvolvimento folicular dos ovários de 27 fêmeas mestiças Suffolk x Western White Face desde 4 a 30 semanas de idade. Quando as fêmeas chegaram a 25ª semana de idade um macho vasectomizado foi colocado em contato indireto pela cerca durante uma semana e na 29ª semana de idade foi deixado em contato direto por mais uma semana. Os autores concluíram que o contato através da cerca resultou no aumento do tamanho folicular e estimulou a formação de algumas estruturas luteais em ovelhas com 25 semanas de idade; e que o subsequente contato à 29ª semana aumentou consideravelmente o número de estruturas luteais.

Lucidi *et al.* (2001) investigaram a resposta endócrina, o momento da ovulação e a taxa de gestação em ovelhas, previamente isoladas por 30 dias, expostas ao macho ou a uma ovelha adulta em diestro (controle) após sincronização do estro com o uso de hormônios. Os autores observaram que a

exposição ao macho antecipou o pico de LH. Na maioria destas fêmeas (7/10) o aumento começou duas horas após a exposição, retornando aos valores basais seis a oito horas mais tarde. Ao passo que, nos animais do grupo controle (6/10) as concentrações de LH começaram a aumentar dentro de 30 a 36. A proporção de ovelhas que ovulou nas 60 horas após a retirada do progestágeno foi de 95% no grupo exposto ao macho contra 55% no grupo controle ($P < 0.05$). A exposição ao macho provoca uma mudança no padrão de secreção do LH, antecipando seu pico e conseqüentemente a ovulação, que normalmente ocorreria entre 40 e 70 horas após a remoção da esponja de progestágeno. Ademais, a taxa de gestação foi significativamente maior no grupo exposto ao macho (73,3 vs 53,3%).

2.2.2 Melatonina e Fotoperíodo Artificial

A melatonina é o principal hormônio secretado pela glândula pineal. Vários estudos mostraram evidências que o padrão de secreção desse hormônio segue o ritmo circadiano, com significativa secreção ocorrendo nos períodos escuros do dia e com luz agindo como fator supressor da secreção. Conseqüentemente as concentrações de melatonina, tanto na glândula pineal como no sangue, são altas à noite e baixas pela manhã. Assim, dias longos são caracterizados por um período curto de secreção de melatonina, enquanto os dias curtos são caracterizados por uma longa duração da secreção. Entretanto, já foi observado que o ritmo circadiano persiste em períodos constantes de escuridão, sendo eliminado em períodos constantes de luminosidade (ROLLAG; NISWENDER⁷, 1976 *apud* ROSA; BRYANT, 2003) ou quando os animais são submetidos à pinealectomia ou à retirada do gânglio cervical superior, quando então a melatonina é secretada em quantidades pequenas ou indetectáveis (DEVESON *et al.*, 1992). Isso indica que o ritmo é gerado endogenamente, presumivelmente sob o controle do SNC (ROSA; BRYANT, 2003).

O uso de melatonina exógena estimula o hipotálamo, a hipófise e as gônadas sexuais, desencadeando a atividade reprodutiva de animais em

7 Rollag, M.D., Niswender, G.D., 1976. Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. *Endocrinology* 98, 482–488.

anestro (TRALDI, 2000). Este hormônio pode ser dado diariamente por injeção, administração oral, administração intraruminal ou através de implantes subcutâneos de liberação lenta (GORDON, 1997).

Sua administração tanto em doses diárias como através dos implantes permite uma mimetização dos dias curtos e, conseqüentemente, pode ser usada para controlar a reprodução sazonal tanto na ovelha como no carneiro. Para o tratamento ser efetivo, é necessário que os animais tenham sido previamente expostos a um período de dias longos (ROSA; BRYANT, 2003). Os machos respondem ao tratamento cerca de 2-3 semanas após (CHEMINEAU *et al.*, 1992) e as fêmeas cerca de 40-60 dias (HARESIGN, 1992).

Noel *et al.* (1999) testaram o efeito de 100mg de melatonina exógena e concluíram que a injeção no final do anestro seguida, 3 semanas depois, do tratamento FGA/eCG aumenta as concentrações plasmáticas de melatonina durante um período de 14 dias e reduz a atresia de folículos médios, o que leva a um aumento no número de folículos grandes e na taxa de ovulação.

Na Espanha, Abecia *et al.* (2007) trabalharam com rebanhos ovinos comerciais de três raças (Rasa Aragonesa, Assaf e Merino) que receberam um implante de melatonina a cada 45 dias e observaram que, independente das condições particulares de cada fazenda, o tratamento com melatonina foi capaz de aumentar o número de cordeiros produzidos nas três raças. Concluiu-se que a melatonina pode ser uma ferramenta útil para melhorar a produção de cordeiros, embora sua eficácia varie de acordo com a raça, local e estação do ano.

O uso de implantes de melatonina para promover a quebra da estacionalidade de rebanhos caprinos e ovinos pode ser associado ao uso de luminosidade artificial (TRALDI, 2000).

A indução do estro através da luminosidade artificial é um método mais utilizado em rebanhos caprinos leiteiros que ficam em sistemas de confinamento ou semiconfinamento. Nestes programas, as fêmeas são submetidas a 16 horas de luz e 8 horas de escuro (FONSECA, 2005b). Geralmente têm duração de 60 dias e os animais apresentam estro cerca de 60 dias após o final do programa (NEVES *et al.*, 1997). Machos também devem ser submetidos ao programa e não há sincronia entre as fêmeas em estro

(GORDON, 1997).

2.2.3 Hormônios

Há mais de 60 anos pesquisadores do mundo todo trabalham no sentido de possibilitar emprego de hormônios no controle do estro e da ovulação em ovelhas. Este controle é geralmente baseado na tentativa de simular a atividade cíclica do CL da ovelha, especialmente sua ação de produzir progesterona por cerca de duas semanas e então, finalizar sua produção e assim completar o ciclo estral (GORDON, 1997).

Ao longo dos anos diversos protocolos hormonais foram desenvolvidos para a sincronização do estro em ovelhas, e a maioria dos que apresentaram bons resultados basearam-se na supressão temporária do estro através do uso de progestágenos (LUTHER *et al.*, 2007). A resposta ovariana em ovelhas e cabras à sincronização do estro varia com o tipo de esponja vaginal e de progestágeno, com o estágio da estação reprodutiva, com o estado nutricional, com o meio ambiente, com o estresse, com a presença do macho (AMARANTIDIS *et al.*, 2004) e com a raça (BOSCOS *et al.*, 2002).

2.2.3.1 Progestágenos

Até 1964 o controle da reprodução em ovelhas envolvia o uso de repetidas doses de P₄ ou administrações orais de progestágenos; o tempo e o trabalho gastos constituíam um grande obstáculo para a aceitação do uso dessas técnicas comercialmente (GORDON, 1997). O período necessário que os progestágenos precisavam ser administrados tornou o método injetável e o oral pouco práticos em relação ao manejo (GODFREY *et al.*, 1997). A administração de progestágenos se tornou comercialmente viável através dos esforços de Robinson e seus colaboradores, em Sydney (ROBINSON⁸, 1964 *apud* GORDON 1997), onde estes desenvolveram esponjas intravaginais impregnadas com progestágeno.

Atualmente, implantes intravaginais de progesterona (CIDR) e esponjas

8 ROBINSON, T.J. Synchronization of estrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges. *Proceedings of the British Society of Animal Production*, v.3, p.31-40, 1964.

intravaginais impregnadas com progestágenos, como o acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou o acetato de fluorogestona (FGA), são comumente utilizados para sincronização do estro em ovelhas (DELIGIANNIS *et al.*, 2005; LUTHER *et al.*, 2007). Segundo Martinez-Garcia (2007) os tratamentos com progestágenos exercem seu efeito alterando a liberação de gonadotrofinas, o crescimento folicular e o ambiente uterino.

A eficácia destes tratamentos na sincronização do estro em ovinos tem sido largamente documentada (GORDON, 1997), mas os efeitos sobre a dinâmica folicular não estão claros nesta espécie (FLYNN *et al.*, 2000).

Os tratamentos clássicos de indução e sincronização de estro, com progestágenos em ovelhas, duram de 12 a 14 dias. A razão para este período, provavelmente, é baseada na mimetização da fase luteal (UNGERFELD; RUBIANES, 1999). Assim, o uso de pessários, impregnados com progesterona ou similares por períodos longos, baseia-se no fato de que haverá período suficiente para que ocorra regressão luteal natural, sem a necessidade do uso de agentes luteolíticos independentemente da fase do ciclo estral (MENCHACA *et al.*, 2001).

A liberação inicial de progestágeno das esponjas intravaginais é alta, mas diminui 63% entre 2 e 13 dias de uso (GREYLING *et al.*, 1994). Similarmente, a liberação de progesterona do CIDR resulta em um aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona durante 3 a 4 dias e a partir do sexto dia essas concentrações diminuem (WHEATON *et al.*, 1993; RUBIANES *et al.*, 1998). Ao final do tratamento por 12 dias com esponjas impregnadas com MAP, Barret *et al.* (2004) obtiveram concentrações plasmáticas de progesterona entre 0 e 1ng/ml, o que corresponde a concentrações subluteais.

Em bovinos, se forem mantidas concentrações subluteais de progesterona (1 a 2 ng/ml) ocorrerá o crescimento prolongado do folículo ovulatório, dando origem a folículos persistentes (SIROIS; FORTUNE, 1990; SAVIO *et al.*, 1993), devido ao aumento na freqüência dos pulsos de LH (MIHM *et al.*, 1999). Estas concentrações de progesterona ocorrem quando as fêmeas bovinas, sem atividade de CL, são tratadas com dispositivo intravaginal por longos períodos e a liberação de progesterona do dispositivo diminui (SIROIS; FORTUNE, 1990). Nesta espécie, os oócitos dos folículos persistentes sofrem maturação prematura *in vivo*, ou seja uma precoce resolução da meiose, o que

provavelmente favorece a baixa fertilidade (REVAH; BUTLER, 1996). A meiose encontra-se parada no estágio de diplóteno e normalmente se reinicia com o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. Estas suprimem a produção do fator inibidor de meiose pelas células da granulosa, desencadeando seu reinício (HAFEZ;HAFEZ, 2004).

Paralelamente, folículos persistentes observados em ovelhas recebendo baixas dosagens de progesterona foram relacionados como causa da baixa fertilidade (JONHSON *et al.*, 1996; UNGERFELD; RUBIANES 1999; VIÑOLES *et al.* 2001). Segundo Menchaca e Rubianes (2004) a explicação para isso é que durante o ciclo estral normal a concentração de progesterona aumenta gradualmente até a luteólise, o contrário do que acontece quando se utiliza dispositivos impregnados com progestágenos. Nesse caso ocorre primeiramente uma alta concentração plasmática de progesterona (supraluteal) nos seis primeiros dias e após isso concentrações baixas (subluteais). Os autores afirmaram ainda que nas ovelhas, como em vacas, concentrações subluteais causam crescimento excessivo e persistência do maior folículo, pois promovem o aumento da pulsatilidade do LH sem, no entanto, promover o pico pré-ovulatório, aumentando assim a idade do folículo ovulatório.

Johnson *et al.* (1996) administraram diferentes concentrações de P_4 em óleo: baixa (≤ 1 ng/ml), intermediária (>1 e <2 ng/ml) ou normal (≥ 2 ng/ml) em ovelhas sem atividade lútea e observaram que os folículos ovulatórios foram maiores e mais velhos e a taxa de concepção foi menor nas ovelhas com baixas concentrações de P_4 . Demonstrando que quando as concentrações subluteais de progesterona são deletérias em comparação as concentrações de progesterona maiores que 1ng/ml. Rubianes *et al.* (1996) demonstraram que durante o ciclo estral das ovelhas, concentrações subluteais de progesterona diminuem o crescimento do folículo dominante da primeira onda. Adicionalmente, Goodman e Karsh em 1980 já tinham demonstrado em ovelhas a relação inversa entre a frequência dos pulsos de LH e as concentrações de progesterona. Além disso, segundo Lewis *et al.* (1974) e Van Cleeff *et al.* (1998), o momento da ovulação ou do pico de LH em relação ao início do estro é mais variável com baixas dosagens de progesterona.

Em contrapartida, concentrações luteais de progesterona promovem

tanto o *turnover* do folículo dominante como a sucessão regular de ondas foliculares em bovinos (SIROIS; FORTUNE, *et al.*, 1990). Já foi demonstrado em ovelhas que a renovação folicular está relacionada com a concentração de progesterona (UNGERFELD; RUBIANES, 1999) e que a suplementação com progestágenos acelera a renovação folicular (NOEL *et al.*, 1994). Assim, na fase luteínica precoce, a progesterona age em conjunto com o estradiol no controle da frequência dos pulsos de LH, enquanto que, posteriormente, na fase luteínica média/tardia a progesterona sozinha é capaz de regular a frequência dos pulsos de LH (MORAES, 2002).

Flynn *et al.* (2000) observaram que na ausência da progesterona luteal, a sincronização com uma única esponja por 14 dias resultou na ovulação de um folículo dominante “velho” ($12,1 \pm 0,6$ dias) e com diâmetro máximo de $7,4 \pm 0,2$ mm. Quando os referidos autores fizeram tratamento por 14 dias com três esponjas trocadas a cada cinco dias, as ondas foliculares emergiram a intervalos mais freqüentes e um folículo de menor duração ($5,1 \pm 0,5$ dias) ovulou com diâmetro máximo de $6,3 \pm 0,2$ mm.

Alguns autores (VIÑALES *et al.*, 2001; MENCHACA; RUBIANES, 2004) relatam que tratamentos progestágenos longos (12 a 14 dias) resultam numa alta porcentagem de animais em estro, mas com fertilidade mais baixa do que em animais com estro natural. A menor duração do tratamento, 5 a 9 dias ao invés dos usuais 12 a 14, tem sido usada com sucesso durante o anestro (CHRISTENSON, 1976; RODRIGUES-IGLESIAS *et al.* 1997; UNGERFELD; RUBIANES, 1999; KNIGHTS *et al.* 2001a,b) e durante a estação reprodutiva (VIÑALES *et al.*, 2001).

Bicudo e Sousa (2003), testaram em ovelhas um protocolo de indução/sincronização de estro de curta duração (6 dias) comparando-o ao protocolo tradicional de longa duração (12 dias), durante a estação reprodutiva, em 260 ovelhas da raça Suffolk, na região de Araçatuba (SP). Foi utilizada esponja vaginal impregnada com 60mg MAP associada a 100µg de cloprostenol e 350 a 400 UI de eCG via intramuscular dois dias antes da retirada da esponja (D4) no protocolo de curta duração e no momento da retirada do implante no protocolo de longa duração. No D6 ou D12 a esponja vaginal foi removida. Verificou-se que no período entre 55 e 72 horas, os percentuais de ocorrência de estro foram 100% no protocolo de curta duração

e 88,5% no de longa. O protocolo curto apresentou menor dispersão na manifestação do estro e foi eficaz na indução/sincronização do estro de ovelhas durante a estação reprodutiva, com a totalidade delas manifestando estro em até 72 horas após a retirada do implante de progesterona.

Dixon *et al.* (2006) compararam o uso de dois CIDR's por 12 dias com o estro natural e observaram 97,7% das ovelhas em estro 60h após a introdução do macho no grupo tratado e 41,6% no grupo controle ($P < 0,01$). Apesar da diferença do número de animais em estro, os autores não observaram diferenças no desenvolvimento folicular e na taxa de concepção. Este estudo mostrou que a sincronização com uma maior quantidade de progesterona (dois dispositivos) resulta em grande resposta de estro, porém a fertilidade se mantém comparável a obtida com estro natural, em contraste à redução na fertilidade nas ovelhas tratadas com baixas dosagens de progesterona observada em alguns estudos (ROBINSON *et al.*, 1967, 1968; ALLISON; ROBINSON, 1970; VIÑOLES, 2001), embora não em outros (EVANS *et al.*, 2001).

Em outro estudo, Viñoles *et al.* (2001) comparando a duração do tratamento progestágeno em ovelhas reportaram que um tratamento longo, de 12 dias de duração, provocou a ovulação de folículos com idade de $7,8 \pm 0,2$ dias em comparação aos folículos de $5,4 \pm 0,4$ dias do tratamento curto (6 dias). Essas diferenças foram refletidas na fertilidade, que foi menor entre o grupo com tratamento longo (63%) e o grupo com tratamento curto (87%).

Prosperi *et al.* (2003) avaliaram a utilização de esponjas intra-vaginais contendo MAP por um período de seis dias contra nove dias em cabras Saanen nulíparas e a taxa de gestação foi de 100% nos dois grupos avaliados, mostrando assim, a eficácia da indução do estro em protocolos curtos em caprinos. Fonseca *et al.* (2005a) conseguiram bons resultados em cabras Toggenburg com o uso de esponja intravaginal associada à aplicação de prostaglandina. E observaram que 89,5% e 84,2% das fêmeas apresentaram estro após o tratamento progestágeno de seis e nove dias, respectivamente ($P > 0,05$).

Em experimento com ovelhas rabo largo no Irã, Shahneh *et al.* (2006) observaram, durante o anestro, que sete dias de tratamento com progesterona (CIDR) comparado com 12 dias, ambos associados a 600UI eCG, aumentou

significativamente a taxa de gestação no primeiro estro após a introdução do carneiro ($70 \pm 4,8\%$ vs $37,5 \pm 5,2\%$).

Knights *et al.* (2001) demonstraram que o pré-tratamento com progesterona por cinco dias antes da introdução do macho foi suficiente para induzir o estro em ovelhas e aumentar as taxas de gestação de 20% para 77%. Os autores enfatizaram que o período mínimo de exposição à progesterona, necessário para induzir o comportamento de estro é, provavelmente, de 3 a 5 dias. E associaram que o aumento da fertilidade em ovelhas sincronizadas com altas dosagens de progesterona pode ser devido à melhora do transporte espermático, à sincronia no início do estro com o pico de LH ou ao padrão de desenvolvimento folicular.

Ungerfeld e Rubianes (1999), utilizaram 277 ovelhas em dois experimentos durante o anestro sazonal para avaliar os protocolos de curta duração com progestágenos associado ao eCG para induzir o estro. No primeiro experimento as esponjas de MAP foram mantidas por seis (grupo I), nove (grupo II) ou treze dias (grupo III) nas ovelhas. A porcentagem de ovelhas em estro foram 92,3%; 85,7% e 96,4% e as taxas de concepção foram 66,7%; 75,0% e 63,0%, respectivamente para os grupos I, II e III ($P > 0,05$). No segundo experimento, a esponja de MAP foi mantida por um, dois, três, seis ou doze dias em ovelhas multíparas. A porcentagem de ovelhas em estro foi maior nos grupos que permaneceram com a esponja por três, seis ou doze dias (72,2%, 93,8% e 87,5%, respectivamente) do que as ovelhas que mantiveram a esponja por um ou dois dias (25,0% e 33,3%, respectivamente, $P < 0,05$), tendo a máxima resposta com seis dias de manutenção da esponja. Em ambos experimentos os autores concluíram que o tratamento de curta duração de seis dias é mais efetivo que o tratamento tradicional de longa duração para a indução de estro. E que, dentre os protocolos curtos, o de seis dias parece ser o intervalo mais apropriado, em comparação com os de um, dois e três dias.

Em contraste, Evans *et al* (2001) compararam ovelhas que receberam apenas uma esponja de progestágeno com ovelhas que receberam três esponjas por 14 dias. Os autores observaram que a idade média do folículo ovulatório foi maior ($P < 0,05$) no grupo com apenas um implante ($9,0 \pm 0,8$ dias vs $4,2 \pm 0,7$ dias), mas não houve diferença no tamanho do folículo ovulatório ($5,7 \pm 0,3$ vs $5,1 \pm 0,3$ mm). A diferença na idade do folículo não interferiu na

qualidade dos embriões recuperados e nem na taxa de gestação (92% e 90%); concluindo que os folículos “velhos” produzem oócitos de igual competência em relação aos folículos “jovens”, com capacidade de fertilizar e se desenvolver em embriões de boa qualidade. Evans (2003a) relatou, em recente revisão de literatura sobre crescimento folicular e fertilidade em ovelhas, que diferente do que ocorre em bovinos, o efeito prejudicial da ovulação de folículos “velhos” ainda não está claro nos pequenos ruminantes.

2.2.3.2 Prostaglandina F₂α e seus análogos sintéticos

A prostaglandina F₂α (PGF₂α) tem sido amplamente utilizada na reprodução de ruminantes (BEAL, 1996), sendo considerado o agente luteolítico mais potente em ovelhas (McCRACKEN *et al.*, 1972). A aplicação ao acaso em ovelhas cíclicas é efetiva em induzir e regressão luteal na maioria dos animais, com conseqüente retorno ao estro cerca de 70 a 80 horas após a aplicação (ROBERTSON, 1977; GORDON, 1997; BARRET, *et al.*, 2002).

A degeneração luteal é caracterizada por diminuição no fluxo sanguíneo, inibição da produção de progesterona e morte das células luteais (WILTBANK; NISWENDER 1992). Acritopoulou e Haresign (1980) aplicaram um análogo da PGF₂α em diferentes momentos do ciclo estral e observaram que a responsividade do CL em ovelhas é limitada a um período de 10 dias, do 4º dia após a ovulação até o 14º. Recentemente, Rubianes *et al.* (2003) demonstraram que a refratariedade do CL ovino se restringe aos 3 primeiros dias após a ovulação. Os autores observaram a ocorrência de luteólise, manifestação do estro, ovulação e formação do CL após a aplicação de PGF₂α a partir do terceiro dia após a ovulação, similar ao efeito observado em ovelhas tratadas no quinto dia.

A sincronização do estro com prostaglandina ou seus análogos, resulta numa boa taxa de concepção e são usadas tanto a monta natural como a inseminação artificial (DELIGIANNIS *et al.*, 2005). Por este motivo, este hormônio tem sido usado para sincronização do estro seguida pela inseminação artificial ou monta natural com diferentes resultados (GINTHER *et al.*, 1995; RUBIANES *et al.*, 1997; LYMBEROPOULOS *et al.*, 2001).

Contudo, a dispersão na manifestação do estro impede seu uso de forma mais extensiva, particularmente, em associação aos protocolos de IATF em ovinos. Esta dispersão atribuída ao diferente *status* ovariano entre os animais quando a $\text{PGF}_2\alpha$ é administrada ao acaso, é parcialmente explicada pela prevalência das concentrações de progesterona. Assim, se um grande folículo está presente no início do tratamento, este folículo continua seu desenvolvimento e o estro e a ovulação vão ocorrer logo após a aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$. Porém, se a luteólise é induzida quando o maior folículo estiver em regressão, um novo folículo precisa emergir e crescer, em consequência o estro e a ovulação vão ocorrer mais tardiamente (MENCHACA; RUBIANES, 2004).

Os tratamentos tradicionais com $\text{PGF}_2\alpha$ consistem na administração de duas doses intervaladas em 9 a 14 dias. Nesses, uma alta proporção de ovinos demonstra estro após a segunda aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ no entanto, ocorre uma variação de 4 dias no intervalo para o estro tornando-o impraticável para programas de IATF (GORDON, 1997).

Oliveira *et al.* (2004) avaliaram a performance do tratamento Synchrovine® que consiste no uso de duas doses de 160 μg do agente luteolítico delprostenate intervaladas em sete dias em comparação ao mesmo tratamento com a metade da dose (80 μg) em ovelhas Corriedale durante a estação de monta. A inseminação cervical foi realizada 42 horas após a segunda dose de PG. A proporção acumulada de animais apresentando estro até as 72 horas foi similar entre os grupos (95,3% vs 90,6%, $P>0,05$). O início do estro foi altamente sincronizado, uma vez que começou entre 25 e 48 horas após a segunda dose de PG em 93,1% dos animais com a dose completa e em 83,3% daqueles com a metade da dose ($P>0,05$). Entretanto a fertilidade foi de 40,6% no grupo com dose inteira e 23,8% naqueles com a metade da dose ($P<0,05$), mostrando que a *performance* reprodutiva diminui quando é utilizada a metade da dose do análogo da PG no protocolo Synchrovine®.

Forichi *et al.* (2004) trabalharam com 219 ovelhas Corriedale durante a estação reprodutiva e compararam a resposta entre um protocolo com uma dose de 160 μg de delprostenato (análogo a $\text{PGF}_2\alpha$) com outro que consistia de duas doses intervaladas em sete dias, ambos seguidos de inseminação

artificial cervical, 10-12 horas após o estro natural. Foi observada uma menor resposta do estro nos animais que receberam uma dose (79%) do que nos animais do grupo com duas doses (92%), a fertilidade não diferiu (49% vs 43%), entretanto a prolificidade do grupo com uma dose foi maior (1,39 vs 1,18, $P < 0,05$).

Num estudo com ovelhas da raça Western White Face durante a estação reprodutiva no Canadá, Barret *et al.*, (2002) aplicaram duas doses de 15 mg de PGF₂α, intervaladas em nove dias, começando no início do ciclo estral (dia 4 ao 7) ou no final, do dia 10 ao 12. Os autores observaram que a taxa de ovulação entre os grupos não diferiu ($2,6 \pm 0,7$), entretanto foi 50% maior quando comparada à taxa média de ovulação das ovelhas desta raça ($1,8 \pm 0,2$). O tempo entre o tratamento e a ovulação apresentou grande variabilidade (1 a 9 dias), sendo maior ($P < 0,05$) para o grupo tratado no início do ciclo ($4,0 \pm 0,3$ vs $2,8 \pm 0,4$ dias).

Na Pensilvânia (EUA) durante a estação reprodutiva, Dixon *et al.* (2006) trabalharam com 495 ovelhas Suffolk puras e cruzadas com Dorset com protocolo de duas injeções de 5mg PGF₂α intervaladas em 3 horas; e obtiveram 62,3% das ovelhas entrando em estro dentro de 24 a 72 horas após a segunda aplicação de PG, fertilidade de 58,4% e média de 1,46 cordeiros nascidos/ fêmea tratada. Num outro experimento, os mesmos autores trabalharam com rebanho misto e aplicaram as duas injeções de PGF₂α no mesmo horário. Neste, 61,7% das ovelhas entraram em estro dentro de 24 a 72 horas após o tratamento, fertilidade de 44,4% e prolificidade média de 1,80.

Em 1997, Godfrey e colaboradores na Flórida, aplicaram duas doses de 15mg de PGF₂α (Lutalyse®) intervaladas em 10 dias e observaram que o intervalo entre a aplicação e o estro foi de $2,9 \pm 4$ dias, com taxa de concepção de 86%.

2.2.3.3 Gonadotrofinas

As gonadotrofinas hipofisárias são um componente chave para estimular o crescimento de folículos ovulatórios em ovelhas (PICTON *et al.*, 1990). O crescimento de folículos antrais a partir de 2mm de diâmetro não ocorre na

ausência desses hormônios (BOSCOS *et al.*, 2002). Elas têm sido usadas para estimular a atividade ovariana após o tratamento progestágeno em ovelhas (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Já foi demonstrado, nesta espécie, que tanto a gonadotrofina coriônica eqüina como o hormônio liberador de gonadotrofinas, provêem um período e ovulação mais compacto (MENCHACA; RUBIANES, 2004; ZELEKE *et al.*, 2005). Na maioria dos protocolos de sincronização estes hormônios são usados próximo ao final do tratamento progestágeno (BARIL *et al.*, 1996; HILL *et al.*, 1998).

2.2.3.3.1 Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG)

A eCG é uma gonadotrofina glicoprotéica de alto peso molecular (72KDa) (GOSPODOROWICZ,⁹ 1972 *apud* ALLEN, 2005), produzida pelos cálices endometriais da placenta equina. Os cálices são estruturas com origem fetal, que desenvolvem-se por volta do dia 38-40 na superfície do endométrio do corno gravídico em torno do concepto e estão presentes até por volta dos 120 dias de gestação. Sua principal função é garantir um ambiente endócrino adequado enquanto o feto desenvolve sua placenta (ALLEN, 2005). Na espécie eqüina, a eCG liga-se a receptores específicos presentes nas células da granulosa, da teca e do CL promovendo a ovulação ou luteinização de folículos que se desenvolvem na primeira metade da gestação pelo estímulo contínuo de FSH (EVANS; IRVINE, 1975; URWIN; ALLEN, 1982). Com isso, há a formação de corpos lúteos acessórios nos ovários das éguas gestantes, servindo como fonte adicional de progesterona.

Esta gonadotrofina é constituída por duas subunidades alfa e beta, similares ao LH e FSH (MC DONALD, 1992). Quando administrada em outras espécies de mamíferos, exceto eqüinos, a eCG é capaz de se ligar simultaneamente aos receptores de FSH e LH exercendo tanto atividade folículo estimulante como luteinizante (MURPHY; MARTINUK, 1991). Segundo Allen (2005) a proporção desta atividade é 1,4:1. Sua meia-vida é de 26 horas, sendo considerada prolongada porque não sofre filtração renal e permanece na circulação (MC DONALD, 1992). Em ovelhas o eCG tem uma meia vida longa

⁹ GOSPODOROWICZ, D. Purification and physiochemical properties of the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). *Endocrinology*, v.91, p.101-106, 1972.

de até 60 h, principalmente devido a alta quantidade de ácido siálico em sua molécula (SMITH *et al.*, 1993).

Além disso, a eCG tem capacidade de se ligar aos receptores de LH no CL levando a um aumento na produção de P_4 (BARUSELLI *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004). Em ovelhas aumenta a taxa de ovulação, pois recruta pequenos folículos nos ovários e aumenta a taxa de crescimento de folículos antrais (BARRET *et al.* 2004).

De acordo com Gordon (1997), para o tratamento progestágeno ser efetivo, a indução do estro na contra-estação reprodutiva precisa ter uma quantidade disponível de gonadotrofinas para iniciar os eventos pré-ovulatórios. Para isto se faz necessário o uso de gonadotrofinas exógenas; a mais indicada é a eCG. O momento da ovulação em relação ao início do estro em ovelhas é variável, e a associação de progestágenos e eCG tem sido usada para reduzir esta variação (BARRET *et al.*, 2002; ZELEKE *et al.*, 2005).

A adição de baixas doses de eCG ao tratamento com progestágeno é essencial para garantir o estro e a ovulação em ovelhas em anestro (GORDON, 1997; BARRET *et al.*, 2004). Entretanto, baixas doses de eCG podem ou não causar um leve aumento na taxa de ovulação em ovelhas cíclicas (BOLAND *et al.*, 1979); apesar disso, Barret *et al.* (2004) detectaram um aumento numérico mas não significativo na taxa de ovulação durante a estação de monta. Neste estudo os autores avaliaram o efeito da eCG associada ao tratamento por 12 dias com esponjas de MAP sobre a dinâmica folicular em ovelhas Western White Face na estação reprodutiva e no anestro. Os autores observaram que o efeito da eCG durante a estação reprodutiva foi menos evidente, tendo apenas um pequeno efeito positivo sobre a esteroidogênese, crescimento folicular e taxa de ovulação. Em adição, as ovelhas cíclicas tratadas com eCG apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona mais elevadas após o tratamento do que os animais não tratados com eCG, o que segundo os autores pode ser benéfico uma vez que o aumento de progesterona eCG induzido pode elevar as taxas de gestação em ovinos (NEPHEW *et al.*, 1994). Uma concentração mínima de P_4 é requerida para suportar a sobrevivência embrionária, pois a P_4 estimula o desenvolvimento e secreção das glândulas endometriais que sustentam o

embrião no lúmen uterino antes de sua implantação (WATHES, 1992). Barret *et al* (2004) concluíram que a eCG administrada ao final do tratamento longo de progestágeno tem efeitos limitados sobre a dinâmica folicular ovariana, exceto no que diz respeito à duração do crescimento folicular e à duração da fase estática nos animais em anestro sazonal.

Boscos *et al.*(2002), num estudo feito na Grécia com 30 ovelhas no início da estação reprodutiva, mostraram que a eCG em comparação ao FSH após o tratamento progestágeno, resulta num maior número de CL's funcionais, com correlação positiva ($r=0,667$) com a concentração plasmática de progesterona.

A administração de eCG no momento da retirada da esponja antecipa a ocorrência do estro e do pico de LH, estimula o desenvolvimento de folículos grandes (>5mm) e aumenta a taxa de ovulação em ovelhas (HUSEIN *et al.* 1998). Estes autores utilizaram esponja impregnada com 750mg de progesterona durante 12 dias e 500UI de eCG no grupo tratado e o grupo controle recebeu solução salina. O intervalo entre o final do tratamento e o início do estro foi menor ($P<0,01$) no grupo que recebeu eCG ($31,0 \pm 2,0$ vs $41,0 \pm 4,0$ horas), assim como o intervalo para o pico de LH ($29,0 \pm 2,0$ vs $40,0 \pm 2,0$ horas). Embora o número de folículos grandes tenha sido maior nos animais que receberam eCG, o número de pequenos (2 - 3mm) e médios (>3 - <5mm) foi igual.

Luther *et al.* (2007) obtiveram maior taxa de gestação (70,0% vs 53,1%) após a IA com sêmen congelado em ovelhas Hampshire e Montadale durante a estação reprodutiva, quando o tratamento com progestágeno (14 dias norgestomet) foi associado a 400UI de eCG 36 horas após a retirada do implante. Atribuíram o resultado ao maior número de ovulações por ovelha que, conseqüentemente, eleva as concentrações circulantes de progesterona. Num segundo estudo com ovelhas Hampshire, Columbia e Suffolk, os mesmos autores utilizaram 30mg de fluorogestona associada ou não a 400UI de eCG e a taxa de gestação foi de 66,7% nos animais que receberam eCG contra 37,5% nos que não receberam, entretanto a porcentagem de animais em estro não diferiu (100.0% vs 75.0%).

Em 2005, Ucar e colaboradores utilizaram 30mg do progestágeno cronolone associado ou não a 600UI de eCG para sincronizar o estro de 17

ovelhas da raça Tuj na Turquia. A porcentagem de animais em estro ($77,8 \pm 14,7$ vs $100 \pm 0,0\%$) não diferiu, entretanto este resultado pode ter ocorrido devido ao número reduzido de animais. A receptividade das fêmeas aos machos foi significativamente ($P \leq 0,05$) maior no grupo tratado com eCG ($33,14 \pm 7,71$ vs $9,75 \pm 3,81$ horas). O prolongamento do estro é, presumivelmente, resultado de elevadas concentrações de E_2 (produzida pelos maiores folículos), que induzem o pico de LH, aumentando assim probabilidade de uma alta taxa de ovulação e um conseqüente sucesso na fertilização.

O estudo de Wildeus e Collins (2004) demonstrou que a eCG associada à gonadotrofina coriônica humana (hCG) não se mostrou efetiva em ovelhas deslanadas. Neste estudo, os autores trataram 12 ovelhas com esponjas impregnadas com 50mg de MAP por 14 dias e uma fonte de gonadotrofina desenvolvida para suínos (P.G.600®) contendo 400UI de eCG e 200UI de hCG, no momento da remoção da esponja. Os animais foram inseminados por laparoscopia $54,0 \pm 0,5$ horas após a aplicação da gonadotrofina. O comportamento de estro foi observado em 83% dos animais e, no momento da inseminação a ovulação já tinha ocorrido na totalidade dos animais, onde a média de corpos hemorrágicos foi de $2,33 \pm 0,98$. A taxa de gestação foi de apenas 8% (1/12) e os autores sugeriram que o componente hCG da formulação provocou uma ovulação prematura, tornando o momento da inseminação (54h) muito tarde para que ocorresse a fertilização.

Zelege *et al.* (2005) testaram o efeito do momento de aplicação da eCG (24 horas antes, no momento e 24 horas depois da remoção da esponja) na sincronização do estro e na fertilidade de 202 ovelhas da raça Dorper durante o período de transição para o anestro na África do Sul. Os autores constataram que não houve influência sobre a porcentagem de animais em estro, tempo para o estro e sua duração, bem como, no número de cordeiros nascidos. Entretanto houve diferença ($P < 0,01$) na taxa de gestação, que foi menor (70,2%) no grupo que recebeu a eCG 24h após a remoção da esponja do que nos demais grupos (78,0% e 75,0%).

2.2.3.3.2 *Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)*

A ovulação de folículos antrais pode ser induzida com o uso de

tratamentos hormonais, inclusive de GnRH (GINTHER *et al.*, 1995; RUBIANES *et al.*, 1997; MURDOCH; VAN KIRK, 1998).

O GnRH é o neuropeptídeo chave para o controle da função reprodutiva em todas as espécies de vertebrados (BAKKER; BAUM, 2000). Este decapeptídeo é produzido e liberado pelo hipotálamo (HONLES, 2000) e induz a liberação de hormônio luteinizante pela adenohipófise (THATCHER, *et al.*, 2002; YAMADA *et al.*, 2002).

O GnRH induz à ovulação ou à luteinização do maior folículo presente no momento do tratamento (MACMILLAN; THATCHER, 1991), conseqüentemente uma nova onda folicular é recrutada (THATCHER, *et al.*, 1993). Entretanto o desenvolvimento de uma nova onda fica inalterado se a aplicação do GnRH for realizada antes do estabelecimento da dominância folicular e os efeitos são dose dependentes (RYAN *et al.*, 1998).

A ovulação ocorre aproximadamente 24 horas após a administração do GnRH (ROBERT *et al.*, 1985), e a taxa de ovulação não se altera quando o GnRH é aplicado 12 ou 36 horas após a luteólise (MURDOCH; VAN KIRK, 1998). Rubianes *et al.* (1998) demonstraram que o GnRH induz o pico pré-ovulatório de LH duas horas após a injeção intramuscular em ovelhas durante a estação reprodutiva.

Quando a ovulação de ovelhas em anestro é induzida pela administração de GnRH, uma parte dos animais falha em formar um CL com função normal (BARTLEWISKY *et al.*, 2001a).

Segundo Murdoch e Van Kirk (1998) há um paradigma experimental de que o estímulo da ovulação com GnRH, no início da fase folicular do ciclo de ovelhas, é um prelúdio da insuficiência luteal. Estes autores demonstraram que as concentrações de progesterona são suprimidas após a aplicação im. de um agonista análogo ao GnRH (5µg des-Gly¹⁰-Ala⁶ ethlamide) 12 horas após a indução da luteólise, mas se mantêm similares àquelas em animais após estro natural quando o GnRH é aplicado 36 horas após a luteólise. Neste caso, as concentrações baixas de progesterona são provenientes de corpos lúteos formados a partir de ovulações estimuladas apenas 12 horas após a luteólise anterior, ou seja, ovulações provenientes de folículos com tempo inadequado de desenvolvimento.

Segundo McLeod; Haresign, 1984 e Hunter, 1986, o uso do *priming* de

progesterona por dois a quatorze dias antes da administração de GnRH pode prevenir a formação luteal inadequada.

Bartlewski *et al.* (2004) testaram o efeito do momento da aplicação de GnRH após o tratamento com esponjas impregnadas com MAP. Injeções endovenosas de 125µg de GnRH foram dadas imediatamente ou 24 horas após a retirada da esponja. Estes observaram que o tempo entre a administração endovenosa de 125µg de GnRH e o pico de LH foi de 115 ± 9 minutos em ovelhas em anestro previamente tratadas com MAP, o que não diferiu ($P > 0,05$) de animais tratados apenas com GnRH (111 ± 8 minutos). Os mesmos autores observaram que os únicos parâmetros que diferiram entre ovelhas tratadas e não tratadas com MAP antes da aplicação de GnRH, foram as características do pico, onde tanto a amplitude do pico pré-ovulatório de LH, como a quantidade total de LH secretado no pico foram menores nos animais tratados previamente com MAP do que nos tratados apenas com GnRH. Entretanto, os autores observaram que, quando o tratamento com GnRH foi feito 24 horas após a retirada da esponja, as ovulações e o desenvolvimento subsequente da fase luteal ocorreram em todos os animais, e a amplitude dos picos de LH não diferiram entre ovelhas tratadas com MAP-GnRH e tratadas apenas com GnRH. As observações do grupo de Bartlewski são indicativas de que há um forte efeito inibitório da MAP na função gonadotrófica.

Quando o GnRH foi administrado 24 horas após a remoção do progestágeno e do tratamento com eCG, o pico de LH e a ovulação subsequente foram antecipados em cabras (PIERSON *et al.*, 2003).

Naqvi *et al.* (2001) demonstraram que o uso de GnRH associado à eCG aumentou a eficiência ovulatória de ovelhas superovuladas. Os autores compararam a eficiência de seis protocolos, durante e fora da estação de monta, combinando as drogas eCG, FSH-P, Ovagen, Super-OV e GnRH. Observaram que nos protocolos com GnRH o número de CL/ovelha, o número de CLs e folículos maiores que 5mm/ovelha e a resposta superovulatória (número de ovelhas com mais de 2 CL/número de ovelhas do tratamento) foram significativamente maiores. Na associação de 800UI de eCG com GnRH obtiveram $9,1 \pm 2,60$ CL/ovelha e uma resposta superovulatória de 8/8. Enquanto no tratamento apenas com 800UI de eCG obtiveram $3,0 \pm 0,7$ CL/ovelha e resposta superovulatória de 7/8.

Luther *et al.* (2007) avaliaram o efeito do GnRH e da eCG associados ao tratamento com o progestágeno norgestomet por 14 dias na indução do estro e nas taxas de gestação em ovelhas após a IALP com sêmen congelado. Os autores observaram que o tratamento com GnRH 36 horas após a remoção do implante prejudicou a resposta ao estro quando comparado ao tratamento controle (apenas o progestágeno) e ao tratamento com o implante associado a ambas as gonadotrofinas (progestágeno com GnRH - 75,8% vs controle - 93,8% vs progestágeno com GnRH e eCG - 94,1%). Concluíram que o GnRH sozinho, mas não em combinação com a eCG pode diminuir a resposta do estro. No entanto, assim como no presente estudo, as taxas de gestação não diferiram entre os tratamentos (progestágeno com GnRH - 51,5% vs controle, 53,1% vs progestágeno com GnRH e eCG, 55,9%).

Em um estudo feito durante o anestro em ovelhas da raça Awassi na Jordânia, Husein e Krildi (2003) compararam o efeito do tratamento com GnRH (100µg de cistorelina) e PGF₂α (20mg) associado ou não (controle) de esponja com 60 mg de MAP. Os resultados do estudo mostraram que o pré-tratamento com progesterona durante 4 dias exerceu um efeito positivo na indução do estro de ovelhas em anestro. Os autores atribuíram este resultado ao efeito da progesterona no crescimento e desenvolvimento folicular que acarreta na homogeneidade folicular anterior ao tratamento com GnRH-PGF₂α, permitindo que ocorra a ovulação com sincronia. Como foi mostrado no estudo, o aumento das concentrações séricas de progesterona seis dias após o tratamento com GnRH nas ovelhas que receberam o *priming* evidencia que nestes grupos ocorreu ovulação em resposta à injeção de GnRH, o que resultou na formação de um CL cinco dias depois.

Durante a estação de acasalamento Gil *et al.* (2004) avaliaram a associação do GnRH com o luteolítico delprostenate, um análogo da prostaglandina, em 215 ovelhas Corriedale. Os autores compararam o tratamento que associava duas doses intervaladas em sete dias de 160µg do agente luteolítico à aplicação i.m. de GnRH (8µg de acetato de buserelina) 42 horas após a segunda dose do luteolítico (momento da IA) ao tratamento com o agente luteolítico (controle). Os resultados de fertilidade tenderam a ser maiores no grupo controle (49,5% vs 37,5%, P=0,07), ao contrário da

prolificidade (1,13 vs 1,28, $P=0,07$), não havendo diferença na fecundidade. Os autores sugeriram que a aplicação de GnRH, após o tratamento com agente luteolítico intervalado em sete dias, exerceu um efeito negativo sobre os resultados reprodutivos, provavelmente devido à ovulação antecipada. Mas enfatizaram que a escolha do protocolo deve envolver considerações práticas e econômicas.

2.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica da reprodução em que se obtém o sêmen do macho para introduzi-lo posteriormente nos órgãos genitais da fêmea com auxílio de instrumentos especiais. Neste sistema não existe contato direto entre a fêmea e o macho (EVANS; MAXWELL, 1990). Esta biotécnica representa a primeira linha de biotecnologias da reprodução (FONSECA; BRUSCHI 2005c), sendo a que propicia maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento animal (BICUDO *et al.*, 2003).

As primeiras pesquisas com IA de ovelhas foram realizadas no início do século XX por Ivanov (1907, 1912), que estudou os meios de diluição e as técnicas de reprodução assistida objetivando a aplicação prática da IA nas fazendas. Após a primeira guerra mundial, estudos adicionais liderados por Milovanov, a IA com sêmen fresco e diluído foi usada em larga escala nos programas reprodutivos em ovinos (SALAMON; MAXWELL, 2000).

No Brasil, apesar da imprecisão dos dados, estima-se que o percentual de animais inseminados esteja aumentando, à medida que a caprinovinocultura evolui para a tecnificação e exploração em sistemas de produção mais intensivos. Todavia, ao contrário de bovinos, caprinos e ovinos requerem cuidados adicionais para garantir a eficiência da técnica (FONSECA; BRUSCHI 2005c).

Dentre as principais vantagens da IA estão o melhoramento genético a curto prazo, o aproveitamento de reprodutores de alta qualidade inutilizados para a monta natural, a prevenção da transmissão de doenças venéreas, a multiplicação dos genótipos dentro do rebanho sem aumentar o número de reprodutores no plantel, a implantação de programas de acasalamento durante a contra-estação reprodutiva, o encurtamento da estação de monta e o uso de sêmen de reprodutores de elite por pequenos criadores (AX *et al.*, 2004).

Quando realizada adequadamente, tem poucas desvantagens em sua utilização. Entretanto, é necessário contar com pessoal treinado, dispor de boas condições para o manuseio das fêmeas durante a terapia hormonal e utilizar técnicas adequadas de detecção de estro e inseminação (AX *et al.* 2004). Mobini *et al.* (2005) ressaltam que como qualquer biotecnologia também possui algumas desvantagens, que seriam o custo dos equipamentos para IA propriamente dita e do nitrogênio líquido para manutenção de sêmen congelado, a necessidade da atenção para detecção de estro e inseminação, falta de provas de reprodutores apropriados para as características de produção e o risco de disseminação de características indesejáveis.

Os programas de IA em ovinos requerem a detecção do estro uma ou duas vezes ao dia, acarretando custos com mão-de-obra, alimentação e manejo. Nestes programas a fertilidade depende da sincronia entre os momentos de inseminação e ovulação. Para solucionar estes problemas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) poder ser usada em combinação com a sincronização do estro e da ovulação usando tratamentos hormonais que garantam a mínima variação possível no momento de ovulação entre os animais tratados (EVANS; MAXWELL, 2000).

O sêmen para IA pode ser processado de diferentes maneiras, podendo ser utilizado fresco, resfriado ou congelado. O sêmen fresco é o método preferível, especialmente durante a estação reprodutiva onde sua produção e qualidade estão no seu pico máximo. O uso do sêmen refrigerado é uma estratégia comum quando o reprodutor não se encontra no mesmo local que as fêmeas, podendo permanecer estocado a aproximadamente 4°C e utilizado até 24 horas após a colheita. Finalmente, o sêmen congelado pode ser utilizado por um longo período, além disso é uma maneira de preservar material genético de animais já mortos (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

A inseminação nos pequenos ruminantes pode ser vaginal, cervical ou intra-uterina (via laparoscópica ou transcervical). Estes métodos diferem quanto a sua complexidade e expectativa de êxito (EVANS; MAXWELL, 2000).

A IA intrauterina transcervical em ovelhas é limitada devido à anatomia do cérvix. O cérvix ovino é um órgão tubular, longo e fibroso composto predominantemente por tecido conectivo com uma camada externa serosa e uma camada interna de epitélio luminal. O lúmen é extremamente tortuoso

devido à presença de 4 a 7 anéis cervicais que apontam caudalmente, agindo como uma barreira física à contaminação externa. Esses anéis são o principal obstáculo na inseminação transcervical em ovinos, pois além de se projetarem para o lúmen, o segundo e terceiro anéis, freqüentemente, estão desalinhados do primeiro (KERSHAW *et al.*, 2005), condicionando a deposição do sêmen no fundo de saco vaginal ou no orifício cervical externo (HALBERT *et al.*, 1990ab, CAMPBELL *et al.*, 1996). O tempo médio necessário para transpor a cérvix em ovelhas pode variar de 2 a 12 minutos, sendo, em média $4,8 \pm 0,7$ min (HUSEIN *et al.* 1998).

A taxa de gestação em ovelhas após a IA cervical com sêmen congelado é baixa principalmente devido à inabilidade do sêmen congelado de atravessar o tortuoso canal cervical das ovelhas. Embora se consigam taxas de fertilidade aceitáveis, driblando a barreira cervical, através do uso do laparoscópio para IA intrauterina, atualmente há uma grande tendência de enfatizar o desenvolvimento de técnicas não-invasivas de procedimentos para IA transcervical (NAQVI *et al.*, 2005). Com a deposição do sêmen refrigerado na entrada do óstio cervical só são conseguidas taxas de gestação aceitáveis às custas de uma maior concentração espermática (400 – 600 milhões) ou através de dupla inseminação (BARBAS *et al.*, 2001). Segundo Ax *et al.* (2004), quando utilizado o método transcervical a IA deve ser feita entre 48 e 56 horas após a remoção do pessário de progesterona; utilizando a inseminação laparoscópica combinada com terapia de progesterona e eCG, os autores sugerem que a IA seja feita 56 a 62 horas após a remoção do pessário.

A IA por laparoscopia permite a visualização do útero com mínima invasão da cavidade abdominal. O uso da IA laparoscópica para driblar a barreira cervical resulta em fertilidade e taxa de nascimento aceitáveis (SALOMON; MAXWELL, 2000). Além disso, favorece a utilização de sêmen congelado que, geralmente, é menos fértil que o fresco, uma vez que é “colocado” diretamente na luz uterina. Com esta técnica são necessários 20 milhões de espermatozóides, frescos ou congelados, e pode-se atingir taxa de concepção de 90% (MOBINI *et al.*, 2005). Com esta técnica é possível depositar o sêmen próximo ao local da fertilização minimizando o problema da baixa motilidade e viabilidade pós congelamento, relatados por Lucidi *et al.* (2000) como o maior causa da baixa fertilidade. Entretanto o custo, a habilidade

necessária e a natureza invasiva da técnica limitam a difusão do seu uso a campo (NAQVI *et al.*, 2005).

Alternativamente, a IA transcervical em ovelhas oferece, baixo custo, viabilidade e constitui uma via de acesso ao útero não-invasiva (NAQVI *et al.*, 2001, 2005). No entanto, não é realizada com frequência devido à dificuldade de transposição do cérvix pela tortuosidade dos anéis, anteriormente citada. Barbas *et al.* (2003) realizaram IA cervical 55 ± 1 horas após a retirada da esponja, sem prévia detecção do estro, com dose de sêmen refrigerado de 300 milhões de spz e administração de um análogo da prostaglandina E₁ (PGE₁), o misoprostol (Cytotec®, Searle) e de um agonista dos receptores β-adrenergicos, o sulfato de terbutalina (Bricanyl®, Astra), por via transvaginal e imediatamente após a IA. Não foi conseguida nenhuma inseminação intrauterina e não foi observado qualquer efeito da administração de misoprotol; sulfato de terbutalina no momento da IA, sobre a fertilidade, prolificidade e fecundidade. A taxa de fertilidade geral do estudo foi de 39,62%. Com a técnica de tração cervical consegue-se realizar a inseminação intra-uterina. A taxa de gestação alcançada é em torno de 45% com sêmen congelado e de 80% com fresco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PERÍODO EXPERIMENTAL, LOCALIZAÇÃO E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2006, na cidade de Cachoeiras de Macacu, localizada na mesoregião Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (latitude 22°27'52.90" S, longitude 43°39'06.95" W). Segundo a classificação de Köeppen o clima da região é classificado como CWa, onde temos inverno seco e verão chuvoso, com temperatura anual variando de 18 a 23°C e precipitação pluviométrica anual variando de 2.000 a 2.600mm³. Os estudos foram conduzidos na Fazenda Escola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense e na Fazenda Jororó do Sertão. Durante o experimento foram feitas leituras diárias das temperaturas máxima, mínima e umidade, como mostrado na Tabela 1. As médias pluviométrica e de temperatura na região durante o experimento foram de 0,0 mm³ e 28,10°C (INMET). Os parâmetros ambientais avaliados durante o período experimental estão apresentados no Anexo 1.

Tabela 1 Média dos parâmetros ambientais ocorridos durante o período experimental (Janeiro de 2006)

Parâmetros	Médias ± Desvio padrão
Temperatura do ar (bulbo seco)	27,30 °C ± 1,39
Temperatura máxima	33,80 °C ± 1,89
Temperatura mínima	22,40 °C ± 1,05
Umidade Relativa do Ar	70,78% ± 7,86
Precipitação Pluviométrica	0,00mm ± 0,00

Fonte: INMET, 2006 (Boletim Agroclimatológico mês de janeiro de 2006)

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Ovelhas

Previamente ao início do experimento, as fêmeas ficaram trinta dias apartadas dos machos, no final deste período foi realizado exame ginecológico. Este se baseou na realização do exame ultra-sonográfico, onde se observou a presença de gestação ou de alguma patologia uterina. Após os exames, os animais foram pesados e tiveram a condição corporal avaliada, usando-se um método subjetivo de avaliação, sendo este baseado numa escala de 1 (emaciada) a 5 (obesa), como descrita por Suiter (1994, Anexo 2). Para esta avaliação, as regiões costal e lombar foram palpadas e o escore de condição corporal (ECC) estimado para cada animal. No Anexo 3 encontram-se os dados das avaliações de peso e ECC. Durante o experimento, utilizou-se um total de sessenta e seis ovelhas, sendo cinqüenta e quatro da raça Santa Inês e doze mestiças das raças Santa Inês / Dorper. Na Tabela 2 está demonstrado o número de ovelhas utilizadas em cada tratamento

Tabela 2 Ovelhas utilizadas por tratamento experimental

Grupos Experimentais	T_{Controle}	T_{GnRH}	Total
Ovelhas selecionadas	34	34	68
Ovelhas descartadas	02	–	02
Ovelhas utilizadas	32	34	66

Do total de ovelhas selecionadas duas foram excluídas do experimento, uma devido à morte por picada de cobra e outra por gestação não detectada no exame ultra-sonográfico durante a seleção dos animais. Na Tabela 3 é apresentada a divisão em relação ao local de realização e a raça.

Dentre as 66 ovelhas utilizadas haviam fêmeas pluríparas (48) e nulíparas (14), pois quatro informações quanto à ordem de parto das ovelhas foram perdidas. Os animais eram mantidos num sistema semi-intensivo de criação, onde eram soltos pela manhã e presos no aprisco à noite. O aprisco era constituído por baias com pisos ripados que eram varridas diariamente e mensalmente era feita higienização com lança chamas e cal virgem. O rebanho recebeu acompanhamento veterinário e foi periodicamente vacinado contra

raiva e clostridiose e deverminado a cada três meses. O manejo nutricional diferiu entre as fazendas, enquanto em uma era baseado apenas em pastejo de capim *Brachiaria sp*, na outra os animais eram alimentados no cocho com capim camerum picado (*Pennisetum purpureum*), cana-de-açúcar e concentrado (Anexo 4) além do pastejo em braquiária. O sal mineral (Purinafós®, PURINA, Paulínia, SP) (Anexo 5) e água eram oferecidos *ad libidum* em ambas as fazendas.

Tabela 3 Número de ovelhas utilizadas por tratamento, raça e local do experimento

Grupos Experimentais	T_{Controle}	T_{GnRH}	Total
Ovelhas da raça Santa Inês	25	28	53
Ovelhas mestiças Santa Inês X Dorper	6	7	13
Fazenda Escola UFF	23	26	49
Fazenda Jororó do Sertão	8	9	17
Ovelhas Pluríparas	22	26	48
Ovelhas Nulíparas	7	7	14

3.2.2 Reprodutores

Utilizaram-se dois carneiros da raça Santa Inês e um da raça Dorper, com idades de 1,5 a 3 anos como doadores de sêmen e reprodutores. Antes do início do experimento os machos foram submetidos a exame andrológico, quando se realizou a inspeção e palpação da genitália externa, bem como a avaliação do comportamento sexual. Após a colheita de sêmen, avaliaram-se as características do ejaculado. Os animais não apresentaram nenhum sinal de disfunção orgânica ou reprodutiva, tendo sido, assim, considerados aptos para a reprodução. Em todas as colheitas os resultados das avaliações foram registrados em ficha própria (Anexo 6). No decorrer do período experimental os carneiros eram mantidos isolados em baias com piso de alvenaria ou ripado, medindo cerca de 3m² num sistema semi-intensivo. Os manejos sanitário e nutricional foram semelhantes aos das ovelhas.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As ovelhas selecionadas foram separadas equitativamente em dois

grupos experimentais, controle (T_C) e tratado (T_{GnRH}) de acordo com o escore de condição corporal e peso. O estro foi sincronizado com esponjas intravaginais (D0) impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) mantidas por seis dias. Vinte e quatro horas antes da retirada do pessário (D5) foram administradas 300UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) via intramuscular e 30 μ g de análogo de prostaglandina $F_2\alpha$, o sintético d-cloplorstenol (Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) latero-vulvar subcutâneo. Um dia (24 horas) após a retirada da esponja (D7), o grupo controle (T_C , n=32) recebeu 1ml de solução fisiológica e o grupo tratado (T_{GnRH} , n=34) 25 μ g de Lecirelina um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas, o GnRH (Gestran®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) por via intramuscular. Na Figura 1 está representado o esquema dos tratamentos hormonais.



Figura 1 Representação esquemática do protocolo de indução/sincronização de estro em ovinos (R.E. – retirada da esponja).

3.4 ACOMPANHAMENTO DA OVULAÇÃO

Foram selecionados aleatoriamente vinte animais, sendo dez de cada grupo, para acompanhamento do momento da ovulação, do número de ovulações e do diâmetro folicular. Exames ultra-sonográficos foram realizados pelo mesmo operador, utilizando-se um aparelho modelo Aloka SSD 500 (Aloka Co., Ltda., Tóquio, Japan) equipado com transdutor linear de 5MHz. O transdutor foi adaptado com um tubo de PVC cortado longitudinalmente para

que pudesse ser manipulado externamente ao reto. Para proteção do transdutor foi utilizada uma luva de palpação transretal na qual um dos dedos foi preenchido com gel de carboximetilcelulose, próprio para exame ultrasonográfico, onde foi alocado o transdutor. As ovelhas foram colocadas em estação e contidas em um tronco próprio para pequenos ruminantes, após a remoção das fezes foi introduzido no reto carboximetilcelulose em gel, por meio de uma seringa de 60ml, para lubrificar e aumentar a superfície de contato. O transdutor foi introduzido no reto até a visualização da vesícula urinária e útero. A visualização dos ovários foi obtida rotacionando-se o transdutor lateralmente para ambos os lados, e quando necessário a imagem foi “congelada”.

As imagens dos cornos uterinos e da vesícula urinária foram utilizadas como pontos de referência para localizar os ovários. As avaliações ultrasonográficas foram realizadas 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a retirada da esponja. O número, a posição relativa e o tamanho dos folículos ovarianos maiores ou iguais a 3mm foram devidamente anotados em fichas próprias (Anexo 7). Considerou-se como dia da ovulação quando o maior folículo antes identificado, não estava mais presente.

3.5 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL

Para determinação das concentrações séricas de progesterona, foram colhidas amostras de sangue por venopunção jugular das mesmas fêmeas selecionadas para acompanhamento da dinâmica folicular conforme a Tabela 4. Foram colhidos cerca de 5 ml de sangue de cada animal com agulhas hipodérmicas 40 mm X 12 mm em tubos de ensaio de vidro, sem anticoagulante.

Tabela 4 Coletas de sangue e descrição do momento do tratamento hormonal correspondente ao dia da coleta

Coleta	Descrição
1ª coleta	Inserção da esponja (D0)
2ª coleta	Quarto dia tratamento progestágeno (D4)
3ª coleta	Aplicação de eCG e d-cloprostenol (D5)
4ª coleta	Retirada da Esponja (D6)
5ª coleta	Aplicação de solução fisiológica no T _{Controle} e GnRH no T _{GnRH} (D7)

As amostras foram imediatamente acondicionadas em gelo até o

momento da centrifugação. A centrifugação foi realizada a 400g por 15 minutos. O soro obtido foi congelado em duplicata a -20°C até o momento da dosagem. As concentrações de progesterona foram determinadas pelo método de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida utilizando-se kits comerciais (COAT-A-COUNT®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) no laboratório B.E.T. Laboratories (Rio de Janeiro, RJ – Brasil). A sensibilidade do ensaio, definida como a menor concentração do hormônio detectada, foi 0,03ng/ml.

3.6 COLETA, AVALIAÇÃO E DILUIÇÃO DO SÊMEN

O sêmen foi coletado com auxílio de vagina artificial. Internamente na vagina utilizou-se um plástico em forma de cone a fim de evitar o contato do sêmen com a camisa de látex. A extremidade anterior do plástico foi dobrada em torno da vagina e a outra extremidade acoplada com fita adesiva a um tubo plástico de 10ml, protegido da luz. Antes da coleta, encheu-se a vagina artificial com água à temperatura de 47°C e em seguida, lubrificou-se seu interior com gel de carboximetilcelulose. Após a coleta, o sêmen foi encaminhado para análise e diluição.

As coletas do sêmen foram realizadas com os machos diante de uma fêmea em estro, em uma área de piso reto e antiderrapante. A fim de obter o máximo de volume seminal possível, antes da monta para a coleta propriamente dita, foi deixado que o macho fizesse de uma a três falsas montas.

O exame físico do sêmen consistiu inicialmente na avaliação macroscópica, onde foram avaliadas a coloração, o aspecto e o volume (ml). Em seguida foi realizada a avaliação microscópica, onde foi avaliado o turbilhonamento (0 a 5), a motilidade progressiva (0% a 100%), o vigor (0 a 5) e a concentração espermática (número de espermatozóides/ml). O turbilhonamento foi avaliado numa gota de sêmen fresco apenas sobre uma lâmina em um aumento de 40X. A motilidade progressiva e o vigor foram avaliados em microscopia óptica em um aumento de 100 e 400 vezes, utilizando-se uma gota de sêmen fresco diluído em soro fisiológico a 37°C na proporção de 1:1, colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a

37°C em placa aquecedora. A concentração foi determinada contando-se as células espermáticas em câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400 vezes numa diluição aproximada de 1:400. Para isso, juntou-se uma alíquota de 0,01mL de sêmen à 4mL de formol salina tamponada (CBRA, 1998). O valor médio da contagem nos dois lados da câmara foi multiplicado por 20×10^6 para obter-se o número de espermatozóides/mL do ejaculado. Logo após, baseando-se na concentração determinada e na concentração e no volume da dose inseminante, o sêmen foi diluído e mantido a uma temperatura de 37°C, em banho-maria até sua utilização. As doses inseminantes (25×10^6 espermatozóides móveis /mL) foram envasadas na palheta de 0,25mL, assim que as ovelhas estivessem prontas para serem inseminadas. Foi utilizado como diluidor o Tris-Frutose (EVANS;MAXWELL, 1987), o método de preparo e a fórmula do diluente utilizado encontram-se descritos no Anexo 8.

3.7 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) E COBERTURAS

Os animais de ambos os grupos foram novamente divididos para serem submetidos à IA laparoscópica (LP, n=25, apenas fêmeas Santa Inês) ou monta natural controlada (MN, n=41) utilizando reprodutores de fertilidade comprovada. Os horários de cobertura e inseminação foram devidamente registrados.

3.7.1 Monta Natural

Para realização das coberturas as ovelhas foram rufiadas 12, 24, 36 e 48 horas após a retirada da esponja, utilizando-se o próprio macho reprodutor. As fêmeas foram apartadas em grupos de cinco animais sendo que cada grupo era deixado com o macho por cerca de 10 minutos. Assim que a fêmea aceitava a monta era coberta e retirada do lote. O horário da monta era então anotado em ficha própria (Anexo 9) para o posterior cálculo do momento de início e duração do estro. As fêmeas foram cobertas à primeira detecção e 24 horas após, caso ainda estivessem aceitando a cobertura.

3.7.2 Inseminação Artificial

Após jejum hídrico e alimentar de 24 horas, os animais foram sedados com 3mg de acepromazina intramuscular (Acepran 1%®, E.H.G., Mogi Mirim, SP). Os animais foram então posicionados em decúbito dorsal em macas apropriadas com angulação aproximada de 45° com a cabeça para baixo. Em seguida foi feita tricotomia e anti-sepsia com álcool iodado da região abdominal próxima à glândula mamária. Após aplicação de 1ml do anestésico local (Cloridrato de Lidocaína, Lidovet® 2%, Laboratório Bravet, Rio de Janeiro, RJ), duas incisões pontuais foram feitas na pele com lâmina de bisturi em ambos os lados, a aproximadamente 6 cm da linha alba e a 3 cm da glândula mamária. Duas cânulas com trocateres de 10 mm e 5 mm de diâmetro foram inseridas, uma de cada lado. A inserção na cavidade abdominal foi concomitante a retirada dos trocateres para evitar a perfuração de vísceras e a cavidade foi insuflada com ar comprimido. Uma ótica de 10 mm foi inserida através da cânula no lado esquerdo para visualização do útero. Na outra cânula foi inserido o aplicador envolto em bainha de inseminação previamente preparada com uma agulha de insulina na ponta (BICUDO, comunicação pessoal), de forma que esta ficava protegida pela bainha e só era exposta quando o inseminador solicitasse.

A deposição do sêmen fresco foi feita na curvatura maior de cada um dos cornos, com a agulha penetrando numa angulação de 45°, depositando-se metade da dose inseminante em cada corno uterino. Imediatamente após a IA, as cânulas e o ar foram removidos e foi feito um ponto de sutura na incisão. Antes dos animais serem soltos foi feito o estímulo do clítoris e os mesmos foram mantidos em ambiente tranquilo, sem estresse, e alimentados à vontade.

3.8 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado 45 dias após as inseminações e coberturas. Os exames ultra-sonográficos foram feitos pela via transretal com aparelho Aloka SSD 500®, (Aloka Co., Ltda., Tóquio, Japan) equipado com transdutor linear de 5MHz. O transdutor foi adaptado conforme citado anteriormente. A gestação foi evidenciada pela presença do feto e dos

placentônios.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite. Para o processamento das análises, utilizou-se o programa SAEG 8.1 (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas; Ribeiro Júnior, 2001) desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa e o programa InStat 3. Foram estudadas as seguintes respostas:

- peso corporal (Kg);
- escore da condição corporal (1 a 5);
- intervalo entre a retirada do implante intravaginal e a inseminação artificial por laparoscopia (horas);
- taxa de ovulação (%): número de animais que ovularam/número de animais que realizaram a ultra-sonografia X 100;
- número médio de ovulações: número médio de ovulações por ovelha;
- diâmetro folicular (mm);
- intervalo entre a retirada da esponja e a ovulação (horas);
- concentração sérica de progesterona (ng/ml) em diversos momentos;
- taxa de ovelhas em estro (%): número de fêmeas em estro/número de total de fêmeas tratadas X 100;
- intervalo (horas) entre a retirada da esponja e o início do estro (primeira aceitação de monta);
- duração do estro (horas): intervalo entre a primeira e última aceitação de monta;
- taxa de concepção (%): número de ovelhas gestantes/número de ovelhas expostas x 100.

Para as variáveis quantitativas (peso e escore da condição corporal, intervalo entre a retirada do implante intravaginal e inseminação por laparoscopia, diâmetro folicular, concentração sérica de progesterona em diversos momentos, intervalo da retirada da esponja para o início do estro e para a ovulação, duração do estro) aplicou-se a análise de variância. Sendo que para a comparação de mais de duas médias utilizou-se o Teste de Student - Newman - Keuls (SNK), ao nível de significância de 5%.

Os dados proporcionais (número médio de ovulações, taxa de ovulação,

taxa de ovelhas em estro e taxa de concepção) foram submetidos ao Teste de Qui-Quadrado, ao nível de significância de 5%, para detecção de diferenças entre os tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo são apresentados, considerando-se dois tipos de parâmetros: parâmetros de controle e parâmetros envolvendo resultados. Os parâmetros de controle são aqueles que prestam informação sobre a homogeneidade dos tratamentos, não sendo resultados de determinado tratamento. São eles: peso e escore da condição corporal, intervalo entre a retirada da esponja intravaginal e inseminação por laparoscopia.

Os parâmetros de resultados avaliados foram: taxa de ovulação, número médio de ovulações, concentração sérica de progesterona (ng/ml) em diversos momentos, porcentagem de ovelhas em estro, intervalo da retirada da esponja para o início do estro, duração do estro e taxa de concepção.

4.1 PARÂMETROS DE CONTROLE

Os dados referentes aos parâmetros de controle estão apresentados na Tabela 5. Observa-se homogeneidade ($P > 0,05$) nos três parâmetros entre os tratamentos, desta forma as respostas avaliadas não foram influenciadas por estes parâmetros.

Dezesseis dados de peso corporal não foram computados devido à impossibilidade de realização da pesagem dos animais em uma das fazendas. O escore da condição corporal foi diferente entre as raças, entretanto, isso não pode ser considerado como influência nos resultados, uma vez que, no total esta diferença não se manteve entre os tratamentos, devido à distribuição eqüitativa dos animais.

Tabela 5 Parâmetros de controle avaliados no experimento (média \pm desvio padrão)

Parâmetros	T _{Controle} (n)	T _{GnRH} (n)	Total (n)
Peso (Kg)			
SI	39,84 \pm 6,46 ^a (16)	38,77 \pm 5,66 ^a (19)	39,26 \pm 5,97 ^a (35)
SI/D	46,03 \pm 17,04 ^b (6)	51,23 \pm 10,77 ^b (7)	48,83 \pm 13,65 ^a (13)
Total	41,53 \pm 10,34 ^A (22)	42,13 \pm 9,09 ^A (26)	41,85 \pm 9,58 (48)
ECC			
SI	3,13 \pm 0,39 ^a (24)	3,15 \pm 0,39 ^a (27)	3,14 \pm 0,38 (51)
SI/D	3,58 \pm 0,93 ^b (6)	3,78 \pm 0,64 ^b (7)	3,69 \pm 0,76 (13)
Total	3,22 \pm 0,55 ^A (30)	3,27 \pm 0,51 ^A (34)	3,25 \pm 0,53 (64)
IIA* (horas)			
SI	53,66 \pm 0,89 ^A (10)	53,65 \pm 1,26 ^A (14)	53,65 \pm 1,10 (24)

^{a,b}Médias com diferentes letras na mesma coluna diferiram para o mesmo parâmetro (P<0,05; SNK)

^ALetras iguais na mesma linha (P>0,05; SNK)

SI: Santa Inês; SI/D: mestiças Santa Inês x Dorper

*IIA: intervalo da retirada da esponja para a inseminação artificial

Observa-se que a condição corporal média no estudo foi maior que 3,0. Segundo Moraes *et al.* (2005) a sugestão para a obtenção de ótima produtividade é que as ovelhas devam estar preferencialmente em condição corporal de 3,0. Da mesma forma, Suiter (2004) recomenda condição 3,0 em ovelhas utilizadas para reprodução.

O *status* energético é o fator nutricional de maior importância que influencia o processo reprodutivo. Períodos prolongados de baixa ingestão de energia pelos animais comprometem as funções reprodutivas alterando a fertilidade (O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999). Isso denota a importância da manutenção da condição corporal, como observado no atual estudo, durante um programa de sincronização e inseminação artificial.

Quanto ao intervalo entre a retirada do implante e a inseminação artificial por laparoscopia, não houve diferença no horário da inseminação entre os grupos de tratamento. Isto se deve à metodologia aplicada no experimento, na qual as ovelhas foram inseminadas alternadamente de acordo com o grupo de tratamento (Tabela 5), dessa forma este parâmetro não influenciou a resposta estudada. Os valores mínimos e máximos foram 51,75 e 56,5 horas após a retirada da esponja.

4.2 PARÂMETROS DE RESULTADOS

4.2.1 Avaliação Ultra-sonográfica da Ovulação

Na avaliação ultra-sonográfica foram avaliados a taxa de ovulação, o diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm), o número médio de ovulações/animal e o intervalo entre a retirada da esponja e a ocorrência da ovulação (horas).

Em ovelhas, o exame ultra-sonográfico transretal mostrou-se ser mais difícil de ser realizado e interpretado do que em vacas, devido a problemas como o acesso anatômico, o diâmetro máximo do folículo e a diferença de tamanho entre o folículo dominante e o segundo maior folículo, fato relatado anteriormente por Ravindra *et al.* (1994).

No presente estudo não foi possível detectar a presença de corpos lúteos, uma vez que, a avaliação ultra-sonográfica só foi realizada até um dia após a ovulação. Isso pode ser explicado pelos estudos de Barret *et al.* (2004) e Bartlewski *et al.* (2004), que observaram que em ovelhas cíclicas tratadas com progesterona durante 14 dias e gonadotrofinas, o tempo entre a ovulação e a detecção do corpo lúteo foi de $3,4 \pm 0,3$ e $3,4 \pm 0,2$ dias, respectivamente.

A taxa de ovulação foi de 95%; dos 20 animais avaliados, apenas um animal do grupo tratado com GnRH não ovulou (Tabela 6).

Tratando ovelhas Santa Inês e Dorper com CIDR por cinco dias, Brandão *et al.* (2007) observaram que 77,78% dos animais ovularam. Takada (2004) trabalhou com MAP por 4 dias em ovelhas Suffolk associando bezoato de estradiol na colocação da esponja, D-cloprostenol na retirada e 50µg de GnRH (gonadorelina) 48 horas após e observou que 58% das ovelhas ovularam.

O número médio de ovulações foi 1,16, pois três animais dos 19 ovulados tiveram dupla ovulação. Não foi observada diferença quanto ao número de ovulações entre os grupos de tratamento, sendo $1,11 \pm 0,33$ para T_{controle} e $1,22 \pm 0,44$ para T_{GnRH} (Tabela 6). Os valores mínimo e máximo foram 0 e 2, respectivamente

Tabela 6. Parâmetros de resultados avaliados na ultra-sonografia de ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias, associado ou não à administração de GnRH aplicado 24 horas após a remoção da esponja (média \pm desvio padrão)

	T _{Controle} (n)	T _{GnRH} (n)	Total (n)
Taxa de ovulação (%)	100,00 (10/10)	90,00 (9/10)	95,00 (19/20)
Número médio de ovulações			
MN	1,20 \pm 0,45 (5)	1,25 \pm 0,50 (4)	1,22 \pm 0,44 (9)
IA	1,00 \pm 0,00 (4)	1,20 \pm 0,45 (4)	1,11 \pm 0,33 (9)
Total	1,11 \pm 0,33 (9)	1,22 \pm 0,44 (9)	1,17 \pm 0,38 (18)
Diâmetro Folicular (mm)			
MN	6,10 \pm 0,65 (5)	6,12 \pm 0,25 (4)	6,11 \pm 0,49 (9)
IA	6,88 \pm 0,48 (4)	6,20 \pm 0,76 (5)	6,50 \pm 0,71 (9)
Total	6,44 \pm 0,68 (9)	6,17 \pm 0,56 (9)	6,31 \pm 0,62 (18)
IOV * (horas)			
MN	58,78 \pm 4,49 (5)	58,19 \pm 4,50 (4)	58,52 \pm 4,22 (9)
IA	59,40 \pm 2,54 (4)	58,52 \pm 2,98 (5)	58,91 \pm 2,66 (9)
Total	59,06 \pm 3,55 (9)	58,38 \pm 3,47 (9)	58,72 \pm 3,43 (18)

Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste SNK.

*IOV: intervalo da retirada da esponja para a ovulação

Este resultado se assemelha ao observado por outros autores. Knights *et al.* (2001a) induziram o estro de 275 ovelhas mestiças (com predominância das raças Suffolk e Dorset) com CIDR por cinco dias e observaram uma média de $1,95 \pm 0,1$ ovulações por ovelha. Adicionalmente, lida *et al.* (2004), utilizando protocolo de 12 dias de MAP e 500UI de eCG em 42 ovelhas das raças Suffolk, Dorset e South-down, observaram que o número médio de ovulações foi de $1,21 \pm 0,11$. Takada (2004), no estudo supracitado, observou que o número médio de folículos ovulados foi de $1,17 \pm 0,17$.

Entretanto Bartlewski *et al.* (2004) utilizaram altas dosagens de GnRH 24 horas após a remoção da esponja, mantida por 14 dias, e observaram que o número médio de ovulações foi de $2,3 \pm 0,2$. Barret *et al.* (2004) obtiveram $2,3 \pm 0,6$ ovulações/ovelha dentre os animais tratados com 12 dias de MAP e 500UI de eCG. Esta diferença pode ser atribuída à raça do animal, uma vez que ambos os autores trabalharam com ovelhas *Western white-faced*.

Considerando o lado da ovulação, foi observado um total de nove ovulações no ovário direito e onze no esquerdo. Uma ovelha ovulou em ambos os lados.

O diâmetro folicular (DF) do folículo pré-ovulatório não diferiu entre os

grupos, sendo $6,44 \pm 0,68$ mm para T_{controle} e $6,17 \pm 0,56$ mm para T_{GnRH} (Tabela 6). Os valores mínimo e máximo foram, respectivamente, 5,61 mm e 7,12 mm. Este resultado está de acordo com Ginther *et al.* (1995), Bartlewski *et al.* (1999) e Evans *et al.* (2000) que relatam que o folículo dominante alcança diâmetro máximo de 5–7 mm.

Os dados do diâmetro folicular (DF) observados no presente estudo se assemelham aos observados por outros autores. Flynn *et al.* (2000) utilizaram uma única esponja por 14 dias em ovelhas mestiças Suffolk / Texel e observaram que a média do DF foi $7,4 \pm 0,2$ mm. Entretanto quando os referidos autores trataram as ovelhas por 14 dias com três esponjas trocadas a cada cinco dias, condição semelhante ao do presente estudo, um folículo ovulou com diâmetro máximo de $6,3 \pm 0,2$ mm. Porém, nesses dois estudos de Flynn e seus colaboradores a maior diferença observada foi na “idade” dos folículos ovulatórios. Assim, a sincronização com uma única esponja resultou numa maior frequência dos pulsos de LH e na ovulação de um folículo dominante “velho” ($12,1 \pm 0,6$ dias); enquanto o tratamento com três esponjas trocadas a cada cinco dias resultou na ovulação de um folículo de menor duração ($5,1 \pm 0,5$ dias), provavelmente devido à emergência de ondas a intervalos mais frequentes. Outro estudo cujos resultados se assemelham ao do presente foi o realizado por Evans *et al.* (2001) que compararam ovelhas da raça Suffolk que receberam apenas uma esponja de progestágeno com ovelhas que receberam três esponjas por 14 dias. Os autores observaram que não houve diferença no tamanho do folículo ovulatório ($5,7 \pm 0,3$ vs $5,1 \pm 0,3$ mm).

Para estimar a idade folicular é necessário rastrear o folículo ovulatório desde sua emergência. No presente estudo a “idade” do folículo não pôde ser calculada, uma vez que, a maioria dos folículos rastreados já tinha mais de 4,5 mm quando os exames ultra-sonográficos começaram a ser realizados. Segundo Evans *et al.* (2003) na ovelha, o recrutamento folicular normalmente ocorre quando os folículos medem cerca de 2 a 3 mm, o que não foi possível observar no presente estudo devido às limitações do transdutor utilizado (5MHz). Ademais, a metodologia utilizada não permitiu o acompanhamento do desenvolvimento folicular desde a emergência da onda, uma vez que, a avaliação ultra-sonográfica foi realizada após a retirada da esponja.

O intervalo médio entre a retirada da esponja e a ovulação foi de $58,72 \pm 3,43$ horas. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) em relação ao intervalo entre a retirada da esponja e a ovulação: $59,06 \pm 3,55$ e $58,38 \pm 3,47$ horas para os grupos T_{controle} e T_{GnRH} , respectivamente (Tabela 6). Os valores mínimo e máximo foram 53,65 e 62,31 horas.

Cline *et al.* (2001) utilizaram implante com 3mg de norgestomet por 10 dias associado a 400UI de eCG e obtiveram intervalo entre a retirada do implante e a ovulação de 75,6 horas com variação de 60 a 96 horas. Cardwel *et al.* (1998) utilizaram o mesmo implante associado a 500UI de eCG e observaram que o intervalo entre a retirada do implante e a ovulação foi de 68,6 horas. No presente estudo, este intervalo foi mais curto do que o constatado pela literatura. O intervalo reduzido do tratamento progestágeno pode ter determinado alta concentração circulante de progestágeno, o que possivelmente, antecipou o momento do pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação.

Bartlewski *et al.* (2004) induziram o estro de seis ovelhas com MAP por 14 dias associada de 250ng de GnRH a cada 2 horas durante 24 horas e mais uma injeção de 125 μ g (via endovenosa) 24 horas após a retirada da esponja. Os autores observaram intervalo entre a administração do GnRH e ovulação de $31,2 \pm 2,3$ horas. Liu *et al.* (2007) trataram ovelhas da raça Western White Face em anestro com 250 ng de GnRH a cada duas horas durante 24 horas associado a uma injeção *in bolus* de 125 μ g também pela via endovenosa e o intervalo para ovulação foi de $28,8 \pm 1,92$ horas. Estes intervalos são inferiores ao observado no presente estudo o que ocorreu, provavelmente, pela via de administração - a via endovenosa torna o GnRH mais rapidamente biodisponível - e pela maior dosagem de GnRH utilizada pelos autores. A comparação entre os estudos também deve considerar que o efeito biológico dos diferentes agonistas do GnRH varia. E essa variabilidade depende da sua afinidade pelo receptor, da absorção, distribuição, resistência a biotransformação e da excreção (PADULA, 2005). Além disso, Barret *et al.* (2002) sugeriram que, em ovinos, folículos antrais com tamanho e idade similares podem variar no seu *status* fisiológico e na responsividade às gonadotrofinas.

Interessantemente, Pierson *et al.* (2003) trabalharam com cabras um protocolo muito semelhante (60 mg de MAP + 125µg de cloprostenol + 300UI de eCG + 50µg de GnRH 24 horas após a remoção da esponja) ao do presente estudo, cuja diferença foi a maior dose de GnRH e PGF₂α. Os autores observaram que embora não tenha ocorrido diferença no intervalo para o estro e na duração do estro, o pico de LH foi antecipado nos animais tratados com GnRH e 54% das cabras tratadas ovularam dentro de 50 horas contra apenas 18,2% das fêmeas que não receberam GnRH. Então parece que a dosagem de GnRH é o fator mais importante a ser considerado em programas de sincronização do estro que utilizem este hormônio.

4.2.2 Concentração Sérica de Progesterona

Os resultados das dosagens séricas de progesterona no dia da colocação da esponja (D0), nos dois dias anteriores a retirada da esponja (D4 e D5), no dia da retirada (D6) e um dia após a retirada (D7) estão apresentados na Tabela 7 e Anexo10. A amostra de uma ovelha do T_{controle} foi perdida no D3, não sendo dosada.

Tabela 7 Dia da coleta de sangue e concentração sérica de progesterona (ng/ml) em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias (média ± desvio padrão)

Dia	Progesterona Sérica (n)
0 - inserção esponja	3,24 ± 3,50 (20)
4 - 4º dia progestágeno	2,41 ± 2,77 (20)
5 - aplicação eCG e PGF ₂ α	0,49 ± 0,50 (19)
6 - retirada da esponja	0,28 ± 0,15 (20)
7 - aplicação GnRH	0,38 ± 0,23 (20)

A grande variabilidade, evidenciada pelo desvio padrão, observada nas concentrações iniciais de progesterona pode ser um indício de que uma parte das ovelhas não estava ciclando. Esta hipótese só se confirmaria com a

dosagem seriada durante dez dias mostrando valores subluteais. De acordo com Coelho *et al.* (2006) e Minton *et al.* (1990) só são consideradas em período anovulatório ovelhas com concentrações plasmáticas de progesterona menores que 1ng/ml durante um período de dez dias consecutivos. Ademais, no trabalho supracitado, Coelho e seus colaboradores estudaram o padrão anual de liberação progesterona borregas da raça Santa Inês sob fotoperíodo natural no sudeste do Brasil (latitude 21°59') e observaram que o padrão de secreção foi constante, não havendo diferença entre as quatro estações (3,24 ± 0,18 ng/ml na primavera; 2,72 ± 0,19 ng/ml no verão; 3,12 ± 0,18 ng/ml no outono e 3,18 ± 0,18 ng/ml no inverno). Indicando desta forma, que as fêmeas da raça Santa Inês apresentam atividade cíclica ao longo de todo ano. É importante mencionar que no estudo de Coelho a variabilidade dos dados não foi tão alta como a do presente estudo, provavelmente porque os autores utilizaram o erro padrão para apresentação dos resultados.

Adicionalmente, Sasa *et al.* (2002) estudaram o padrão de secreção de progesterona de borregas da raça Santa Inês no Estado de São Paulo, no período de abril a novembro e observaram que as borregas encontravam-se em atividade cíclica reprodutiva apresentando valores que variaram de 0,08 a 7,36ng/mL. Os autores também concluíram que em São Paulo esta raça não apresenta estacionalidade no ciclo reprodutivo, uma vez que as dosagens de P₄ abaixo de 1ng/ml não se mantiveram por mais de dez dias consecutivos. Traldi (1990), também relatou que a atividade cíclica de ovelhas nesta região do país não cessa ao longo do ano. Assim, a variabilidade das concentrações séricas de progesterona no presente estudo não pode ser correlacionada com a ciclicidade das fêmeas e precisaríamos de mais dados para checar esta hipótese. No entanto há fortes indícios na literatura de que esta raça não apresenta sazonalidade reprodutiva nesta região do país.

As dosagens de progesterona observadas no estudo são referentes à progesterona endógena, uma vez que, segundo Husein e Krildi (2003), o acetato de medroxiprogesterona por ser sintético, não reage com os kits comerciais utilizados nos ensaios para dosagem de P₄. Assim, apenas a P₄ endógena é dosada. Isto explica a queda abrupta (Figura 2) do D4 (2,41 ± 2,77) para o D5 (0,49 ± 0,50), a partir de onde as concentrações se mantiveram

baixas provavelmente devido ao efeito inibitório da MAP no hipotálamo (FIELDS; FIELDS, 1996).

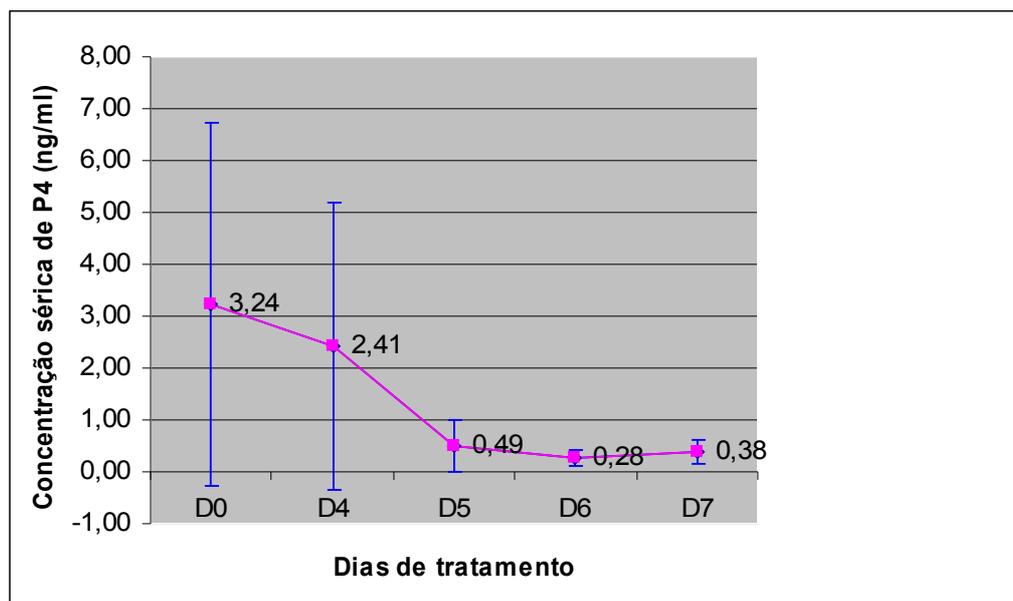


Figura 2 Perfil da concentração sérica de progesterona em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias.

Com este efeito inibitório, a secreção de LH fica bloqueada e, conseqüentemente a síntese de progesterona pelo CL, pois esta é regulada pelo mesmo. Após a ligação do LH ao seu receptor no ovário, ocorre a ativação da adenil ciclase e o subsequente aumento das concentrações de cAMP. A presença de cAMP estimula a esteroidogênese, facilitando o transporte de colesterol para dentro da mitocôndria, que converte o colesterol em pregnenolona pela ação da enzima clivadora de cadeia lateral, localizada na membrana interna da mitocôndria. A ação do LH (via cAMP) é de aumentar a concentração das enzimas esteroidogênicas (MORAES *et al.*, 2002). Como foi observado no presente estudo, quatro dias após a inserção da esponja, a concentração de P₄ se manteve basal, provavelmente proveniente do córtex da adrenal, pois segundo Robertson (1977) concentrações basais de 0,2 ng/ml são provenientes do cortex da adrenal.

Num estudo feito durante o anestro sazonal em ovelhas da raça Awassi na Jordânia, Husein e Krildi (2003) utilizaram esponja de 60 mg de MAP por quatro dias, seguido de GnRH (100µg de cistorelina) e prostaglandina (20mg PGF₂α). Os autores observaram que as dosagens de P₄ não diferiram ao longo do estudo e ficaram em concentrações basais de 0,2 ± 0,04 ng/ml um dia antes

da inserção do progestágeno; $0,1 \pm 0,02$ ng/ml no dia da remoção e $0,2 \pm 0,00$ ng/ml no dia da aplicação do GnRH. Isso mostra que a dosagem foi apenas da P_4 endógena. Em comparação ao presente estudo, não ocorreu uma queda abrupta, pois as ovelhas estavam em anestro sazonal, sendo que, provavelmente, a P_4 dosada pelos autores era proveniente do córtex da adrenal. Os resultados também estão de acordo com o observado por Barret *et al.* (2004) que, ao final do tratamento por doze dias com esponjas impregnadas com MAP, obtiveram concentrações séricas de progesterona entre 0 e 1ng/mL.

4.2.3 Detecção do Estro

No total, 97,56% dos animais apresentaram estro. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos de tratamento: 100% (20/20) dos animais apresentaram estro no T_{controle} e 95,24% (20/21) no T_{GnRH} .

O resultado deste estudo está de acordo com o obtido por outros autores. Segundo Knights *et al.* (2001) o período mínimo de exposição à progesterona necessário para induzir o comportamento de estro varia de 3 a 5 dias. Assim, o período de exposição à progesterona utilizado no presente estudo, de 6 dias, foi suficiente para induzir o comportamento estral. Luther *et al.* (2007) utilizaram 30mg de fluorogestona por 12 dias associada a 400UI de eCG e obtiveram 100% dos animais em estro. Os mesmos autores quando utilizaram um tratamento de norgestomet por 14 dias associado à eCG e GnRH 36 horas após e retirada do implante obtiveram 94,1% dos animais em estro, resultado que, conforme o presente estudo, também não diferiu de quando utilizado o progestágeno acrescido apenas de eCG (86,7%). Em 2005, Ucar e colaboradores utilizaram 30mg do progestágeno cronolone por 14 dias associado a 600UI de eCG e observaram 100% dos animais em estro. Zeleke *et al.* (2005) obtiveram 98,3% de ovelhas da raça Dorper em estro após sincronização com progestágeno por 14 dias e eCG aplicada 24 horas antes da remoção do implante. Simonetti *et al.* (1999) trataram 300 ovelhas da raça Merino, dentre jovens e adultas, com esponja impregnada com 60mg de MAP por 14 dias, na retirada da esponja aplicaram 375UI de eCG e expuseram as ovelhas ao macho durante 96 horas, avaliando-as a cada quatro horas para

observação do estro. A resposta de estro ocorreu em 92,93% dos animais. Boscós *et al.*, (2002) demonstraram que 52,9% dos animais que apresentavam atividade ovariana prévia, apresentaram estro em resposta a doze dias de tratamento progestágeno. Assim, parece que a duração do tratamento progestágeno não exerce influência na porcentagem de animais em estro, e tanto tratamentos progestágenos longos como curtos inibem o eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal, de forma que, na retirada do progestágeno resultam em uma alta porcentagem de animais apresentando estro.

No atual experimento, ambos os protocolos resultaram numa sincronização eficiente, uma vez que, 70,7% (29/41) dos animais apresentaram estro até 24 horas após a retirada da esponja (Figura 3).

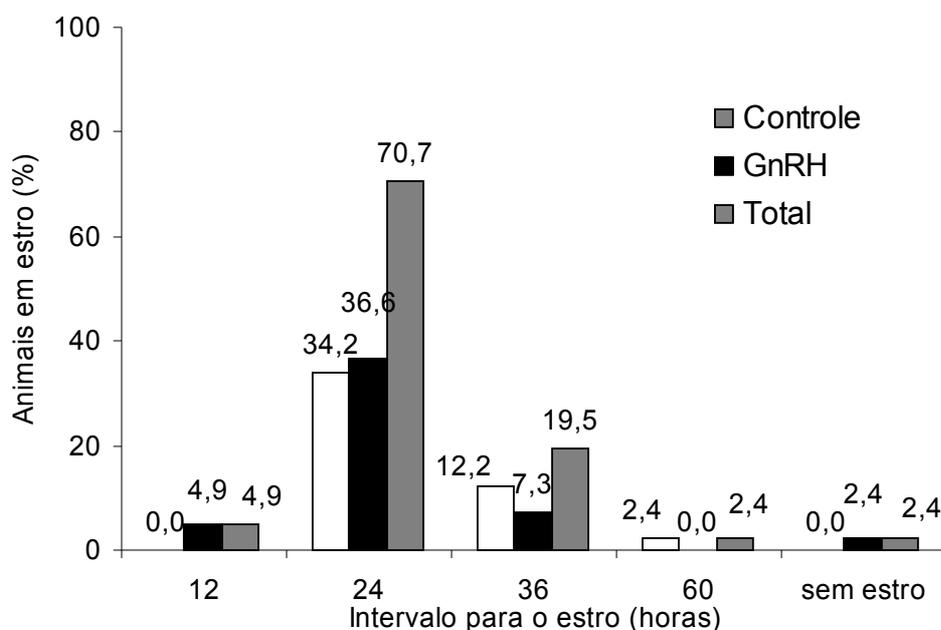


Figura 3 Porcentagem de animais, submetidos à monta natural, apresentando estro 12, 24, 36 e 60 horas após a retirada da esponja, bem como porcentagem de animais que não apresentaram estro nos dois grupos de tratamento.

Este resultado mostrou-se superior ao obtido em outros estudos. Viñoles *et al.* (2001) verificaram que até 144h após a retirada da esponja, 79% dos animais haviam apresentado estro mediante tratamento com 6 dias de MAP e 200UI de eCG. No estudo de Knights *et al.* (2001), com ovelhas em anestro, o

tratamento com CIDR por 5 dias resultou em apenas 9% dos animais em estro nas primeiras 24 horas após a retirada da esponja, entretanto a porcentagem cumulativa de 77% até as 72 horas foi considerada satisfatória. Simonetti *et al.* (1999) observaram uma taxa de 58% dos animais em estro entre 46-50 horas, após tratamento com MAP por 14 dias, e consideraram uma boa taxa de sincronização.

O início do estro ocorreu pela manhã (24 horas após retirada da esponja) em 70,7% (29/41) dos animais e no final da tarde (12, 36 e 60 horas após retirada da esponja) em 26,8% (11/41) dos animais, resultado que difere em parte do estudo de Knights *et al.* (2001) em que 48% dos animais apresentaram estro pela manhã (48 horas após a retirada do implante) e 19% apresentaram estro no final da tarde (72 horas).

A diferença entre os resultados obtidos no presente estudo e os observados na literatura pode ser atribuída à raça, idade ou localização geográfica do estudo, que podem influenciar a resposta do estro (EVANS;MAXWELL, 1986; GORDON, 1997) e ao prévio isolamento das fêmeas realizado no presente estudo. Segundo Ungerfeld e Rubianes (1999) a introdução repentina do macho em um rebanho de ovelhas previamente isoladas encurta o intervalo para o estro, pois promove um aumento na frequência dos pulsos de LH, o que estimula o crescimento folicular e a secreção de estrógenos.

No presente estudo apenas 2,44% (1/41) das ovelhas não apresentaram estro. Na figura 3 é o representante da classe “sem estro”, esta ovelha foi excluída das análises de intervalo para o estro e duração de estro. Assim, a resposta “detecção do estro” foi calculada sobre um total de 41 animais e as respostas “intervalo para o estro” e “duração do estro” foram calculadas sobre um total de 40, pois a ovelha que não apresentou estro foi retirada.

4.2.3.1 Intervalo da retirada da esponja ao início do estro

O intervalo da retirada da esponja ao início de estro (IE) foi similar ($P>0,05$) nos animais submetidos à monta natural entre os grupos de tratamento e raça (Santa Inês e mestiças Dorper). O IE do grupo tratado com GnRH foi $29,85 \pm 6,98$ horas (variação aproximada de 1-1,5 dias) e o do grupo

controle foi $32,95 \pm 7,49$ horas (variação aproximada de 1-1,5 dias) (Tabela 8).

Tabela 8 Intervalo em horas entre a retirada da esponja e o início do estro em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias, associado (T_{GnRH}) ou não (T_{Controle}) à administração de GnRH (média \pm d.p.)

Tratamento	Raças		
	Mestiças (n)	Santa Inês (n)	Total (n)
T_{Controle}	$29,50 \pm 0,43$ (6)	$34,43 \pm 8,61$ (14)	$32,95 \pm 7,49$ (20)
T_{GnRH}	$29,50 \pm 0,39$ (7)	$30,04 \pm 8,78$ (13)	$29,85 \pm 6,98$ (20)
Total	$29,50 \pm 0,00$ (13)	$32,31 \pm 8,81$ (27)	$31,40 \pm 7,32$ (40)

Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste SNK.

O mesmo resultado foi encontrado por Pierson *et al.* (2003) que não observaram diferença no IE em cabras tratadas ($39,3 \pm 3,76$ horas) e não tratadas ($45,7 \pm 4,35$ horas) com GnRH 24 horas após a remoção do progestágeno, embora tenha ocorrido no estudo uma antecipação do pico de LH. Em outro estudo feito durante o anestro de ovelhas da raça Awassi na Jordânia, Husein e Krildi (2003) observaram IE de $44,3 \pm 5,1$ horas após tratamento com esponja de 60 mg de MAP por quatro dias, seguido de GnRH (100 μ g de cistorelina) e prostaglandina (20mg $\text{PGF}_2\alpha$). Provavelmente o maior intervalo observado no estudo de Husein e Krildi está relacionado ao fato de ter sido feito quando as ovelhas apresentavam anestro sazonal.

Os valores mínimo e máximo para o IE foram respectivamente, 13,5 a 65,1 horas (aproximadamente 1-3 dias). Este intervalo é semelhante ao observado por outros autores. Barret *et al.* (2004) num estudo com ovelhas Western White Face tratadas com 12 dias de P_4 e 500UI de eCG durante a estação reprodutiva obtiveram intervalo entre a remoção da esponja e o estro de 62,4 horas ($2,6 \pm 0,2$ dias). Ainda, Zeleke *et al.* (2005) trabalhando com ovelhas da raça Dorper durante o período de transição para o anestro na África do Sul, obtiveram IE de $39,5 \pm 1,21$ horas com protocolo de 14 dias de progestágeno associado à 300UI de eCG 24 horas antes da remoção do implante. Utilizando MAP também por 14 dias e, na retirada da esponja, 375UI de eCG Simonetti *et al.* (1999) observaram que o IE variou de 26 a 68 horas com média de $46,88 \pm 11,78$ horas. Adicionalmente, Husein *et al.* (1998)

utilizaram esponja impregnada com 750mg de progesterona durante 12 dias e 500UI de eCG e observaram IE de $31,0 \pm 2,0$ horas.

Flynn *et al.* (2000) observaram IE de $3,0 \pm 0,5$ dias em ovelhas sincronizadas por 14 dias com três esponjas colocadas e tiradas uma a uma a cada cinco dias. Em comparação ao presente estudo (13,5 a 65,1 horas ou 1 a 3 dias), este intervalo é mais longo, pois os autores não utilizaram eCG. A administração de eCG no momento da retirada da esponja antecipa a ocorrência do estro em ovelhas (HUSEIN *et al.*, 1998). Tratamentos com baixas doses de eCG aumentam significativamente a esteroidogênese dos folículos antrais (BARRET *et al.*, 2004). Isso explica o menor intervalo para o estro no presente estudo, uma vez que, o estro é induzido, basicamente, pelo efeito do estrogênio no sistema nervoso central. Quando o hipotálamo é previamente exposto à progesterona, baixíssimas concentrações séricas de 17β -estradiol (15 pg/ml) são capazes de induzir à receptividade sexual (ROBERTSON, 1977). A progesterona exerce um *priming* sobre os centros comportamentais do cérebro, de forma que o comportamento de estro será induzido pelo aumento posterior dos estrógenos (RUBIANES, 2000a), o que é conseguido pela inserção do implante de progestágeno seguido da administração de eCG.

4.2.3.2 Duração do estro

A duração do estro (DE) não variou ($P>0,05$) entre os grupos T_{GnRH} ($31,55 \pm 10,45$ horas) e T_{controle} ($37,45 \pm 9,01$ horas) (Tabela 9).

Tabela 9 Duração do estro (horas) em ovelhas tratadas com implante de progestágeno por seis dias, associado ou não à administração de GnRH (média \pm d.p.)

Tratamento	Duração do Estro (h)		
	Dorper (n)	Santa Inês (n)	Total (n)
T_{Controle}	$36,00 \pm 7,59$ (6)	$38,07 \pm 9,75$ (14)	$37,45 \pm 9,01$ (20)
T_{GnRH}	$34,28 \pm 4,53$ (7)	$30,08 \pm 12,49$ (13)	$31,55 \pm 10,45$ (20)
Total	$35,08 \pm 5,92$ (13)	$34,22 \pm 11,67$ (27)	$34,50 \pm 10,08$ (40)

Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) pelo teste SNK.

Este resultado era esperado, uma vez que, a dosagem de eCG foi a mesma para os dois grupos, e o efeito deste hormônio se sobrepõe ao efeito do GnRH no que diz respeito à duração do estro. Já foi demonstrado por Ucar *et al.* (2005) que a receptividade das fêmeas aos machos é maior ($P < 0,05$) quando os animais são tratados com eCG ($33,14 \pm 7,71$ horas com eCG vs $39,75 \pm 3,81$ horas sem eCG).

Os valores mínimo e máximo da DE foram respectivamente, 12 e 53 horas. Este resultado se assemelha ao encontrado por Mobini (2002) que relatou que, na ovelha, o estro pode variar de 15 a 45 horas (média de 30). Entretanto diferiu de Robertson (1977), que considera que o intervalo médio de receptividade sexual é de 24 a 30 horas. De acordo com Gonzalez (2002), de forma geral, este período tem duração de 24 a 48 horas, podendo variar com a raça e a taxa de ovulação. Isto pode explicar a menor DE ($18,7 \pm 1,7$ horas) observada por Zeleke *et al.* (2005) em ovelhas da raça Dorper. Estas receberam implante de progestágeno por 14 dias e 300UI de eCG 24 horas antes da remoção do implante, durante o período de transição para o anestro na África do Sul.

4.2.4 Taxas de concepção

As taxas de concepção foram similares ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamento e entre os métodos de acasalamento. Este resultado concorda com o obtido por Reyna *et al.* (2007), que concluíram que embora a aplicação do GnRH 36 horas após a remoção da esponja tenha melhorado a sincronização da ovulação, não exerceu efeito algum sobre as taxas de concepção. As taxas podem ser observadas na Tabela 10.

Tabela 10 Taxas de concepção através da monta natural (MN) ou inseminação artificial laparoscópica (IALP) em ovelhas da raça Santa Inês e mestiças Dorper submetidas à sincronização do estro associada (T_{GnRH}) ou não (T_{Controle}) à administração de GnRH

	T_{Controle} (n)	T_{GnRH} (n)	Total (n)
Monta Natural	65,0% (13/20)	45,0% (9/20)	55,0% (22/40)
IALP	40,0% (4/10)	35,7% (5/14)	37,5% (9/24)
Total	57,0% (17/30)	41,0% (14/34)	48,0% (31/64)

Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste SNK.

No presente estudo a taxa de concepção média alcançada com a monta natural em ambos os tratamentos foi de 55,00%. Este resultado é semelhante ao observado por diversos autores. Viñoles *et al.* (2001) observaram, em ovelhas cíclicas, taxas de gestação de 58% com monta natural após sincronização com esponja de 60mg de MAP por seis dias e 200UI de eCG. Quando os autores não utilizaram a eCG, obtiveram uma maior taxa de gestação (87%). Eles associaram o pior resultado ao desenvolvimento de cistos foliculares, observados por ultra-sonografia, nos animais tratados com eCG quando as concentrações de P_4 ainda estavam altas e concluíram que a eCG exerceu um efeito deletério em combinação aos tratamentos curtos com MAP, esta situação não se repetiu no presente experimento. Knights *et al.* (2001) utilizaram CIDR[®] por cinco dias em 257 ovelhas em anestro e observaram taxa gestação de 53% após monta natural. Dixon *et al.* (2006) avaliaram a performance reprodutiva em resposta a sincronização do estro durante a estação reprodutiva. Estes autores utilizaram um implante (CIDR[®]) por cinco dias em combinação com 5mg de $PGF_{2\alpha}$ (lutalyse[®]), que foi administrada um dia antes da retirada do implante. A taxa de gestação no primeiro período de serviço foi 56,6%.

Entretanto, os mesmos resultados diferem de outros estudos. Em experimento com ovelhas rabo largo no Irã, Shahneh *et al.* (2006) observaram, durante o anestro, que sete dias de tratamento com progesterona (CIDR) associado a 600UI eCG, resultou em taxa de gestação de $70,0 \pm 4,8\%$. Em trabalho com ovelhas no final do anestro estacional Ungerfeld e Rubianes (1999) obtiveram taxa de concepção de 66,7% após tratamento por seis dias com MAP e 400UI de eCG seguido de monta natural. Knights *et al.* (2001) demonstraram que o pré-tratamento com progesterona por cinco dias antes da introdução do macho é suficiente para induzir o estro de ovelhas em anestro e aumentar as taxas de gestação de 20% para 77%. Greyling *et al.* (1994), verificaram a eficiência de esponja com 60mg de MAP por 14 dias associada a 300UI eCG no momento da retirada da esponja e a taxa de concepção após monta natural foi 75,0%. Prosperi *et al.* (2003) avaliaram a utilização de esponjas intra-vaginais impregnadas com 60mg de MAP por seis dias associada à aplicação de 250UI de eCG em cabras Saanen nulíparas.

Obtiveram taxa de gestação de 100% (n=16), mostrando a eficácia da indução do estro em protocolos curtos em caprinos.

A taxa de gestação obtida com a inseminação artificial laparoscópica (IALP) com sêmen fresco foi de 37,5% (9/24), resultado inferior ao da literatura. Luther *et al.* (2007) trabalhando com ovelhas Hampshire e Montadale obtiveram taxas de gestação de 55,9% após IALP com sêmen congelado e sincronização com norgestomet por 14 dias, 400UI de eCG e uma dose de GnRH 36 horas após a remoção do implante. Em um segundo estudo com ovelhas Hampshire, Columbia e Suffolk, os mesmos autores utilizaram 30mg de fluorogestona associada a 400UI de eCG e a taxa de gestação foi de 66,7%. Lucidi *et al.* (2001) utilizando protocolo de 12 dias de FGA, 500 UI de eCG e 125µg de d-cloprostenol e inseminação com sêmen congelado 60 horas após remoção da esponja obtiveram taxa de gestação de 53,3%. Os resultados da IA do presente estudo se assemelham aos obtidos com IA transcervical por Barbas *et al.* (2003) cuja taxa de gestação obtida foi de 39,62%. Bicudo *et al.* (2002), empregaram o CIDR® durante 14 dias em associação a 500 UI de eCG na sincronização do estro de ovelhas durante a estação reprodutiva. Os autores realizaram IA cervical com sêmen fresco e observaram taxa de concepção de 47,8%. A disparidade na taxa de gestação observada entre os estudos pode ser devida à variação na qualidade seminal (SALAMON; MAXWELL, 1995) ou à raça dos animais (FAIR *et al.*, 2005).

A taxa de gestação total do presente estudo teve influência da IALP. Possivelmente o resultado (35,7%) com a IALP, ocorreu devido ao momento em que a IA foi realizada após a retirada da esponja ($53,65 \pm 1,10$ horas).

No presente estudo, a média do intervalo entre a retirada da esponja e a IA ($53,65 \pm 1,10$ horas) foi muito próxima ao momento da ovulação, que ocorreu em média $58,72 \pm 3,43$ horas após a retirada do implante. Isto pode ter contribuído na fertilidade do grupo inseminado (35,7%), uma vez que, o sêmen fresco precisa ficar algumas horas no trato genital feminino, para que ocorra a capacitação espermática (GHANG, 1984; COHEN *et al.*, 2004; BREITBART *et al.*, 2005) e, portanto, para que os espermatozóides estejam aptos a fertilizar o oócito, que tem um tempo mais reduzido de viabilidade. De acordo com Chang (1951), em um artigo publicado na revista Nature, este tempo varia de 20 a 30 horas em ovinos. Desta forma, quando os espermatozóides estavam aptos

para a fertilização, provavelmente o oócito estava envelhecido, determinando assim uma menor fertilidade.

Segundo Maxwell *et al.* (1983)¹⁰ *apud* Gordon (1997), existe uma relação entre a fertilidade e o momento da IA intrauterina. Utilizando-se sêmen fresco podem ser conseguidas taxas de fertilidade de 97% quando o intervalo entre a retirada da esponja e a IA é de 48 horas. Com sêmen congelado, a IA deve ser realizada de 48 a 55 horas após a retirada do implante. Intervalo este que corresponde ao intervalo entre a retirada da esponja e a ovulação encontrado no presente estudo ($58,72 \pm 3,43$ horas). O maior intervalo entre a retirada da esponja e a IA com sêmen congelado, ou seja, a realização da IA mais próximo da ovulação, se deve ao fato do processo de criopreservação induzir alterações na membrana do espermatozóide funcionalmente equivalentes àquelas induzidas pelo processo de capacitação (GILLAN *et al.*, 1997), não sendo necessário que os espermatozoides fiquem algumas horas no trato genital feminino antes de encontrar o oócito. Gillan *et al.* (1997) demonstraram que o sêmen congelado apresentou 65,9% dos espermatozoides capacitados enquanto o sêmen fresco tinha apenas 54% após incubação por seis horas a 37°C. Assim, de acordo com o estudo de Luther *et al.* (2007), o intervalo para a IA de $53,65 \pm 1,10$ horas, utilizado neste estudo, seria mais apropriado para inseminação com sêmen congelado.

Por fim, o sucesso da fertilização depende da hora em que é realizada a IA, ou do momento relativo à ovulação, assim o controle desses fatores pode melhorar as taxas de gestação.

10 MAXELL, W.M.C.; BUTLER, L.G.; WILSON, H.R. Fertility after intra-uterine insemination with frozen ram semen. *Proceedings of the 15th Annual Conference of the Australian Society for Reproduction Biology* p.92, 1983.

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- O uso de esponja impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por seis dias associados a 300UI de eCG e 30µg de prostaglandina F_{2α}, induz e sincroniza o estro em ovelhas, independentemente da aplicação de 25µg de GnRH 24 horas após a remoção da esponja;
- A utilização de 25µg de GnRH 24 horas após a remoção da esponja não altera a taxa de concepção.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J.A.; VALARES J.A.; FORCADA, F.; PALACÍN, I.; MARTÍN, S.; MARTINO, A. The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain *Small Ruminant Research* v.69, p. 10–16, 2007

ACOSTA, T.J. & MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p. 127-140, 2004.

ACRITOPPOULOU, S., HARESIGN, W. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF₂α given at different stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* v.58, p.219-221, 1980.

ALLISON, A.J., ROBINSON, T.J. The effect of dose level of intravaginal progestagen on sperm transport, fertilization and lambing in the cyclic merino ewe *Journal of Reproduction and Fertility* v.22, p.515-531, 1970.

AMARANTIDIS, I.; KARAGIANNIDIS, A.; SARATSIS, Ph.; BRIKAS, P. Efficiency of methods for estrous synchronization in indigenous Greek goats *Small Ruminant Research* v. 52, p. 247-252, 2004.

ANUALPEC *Anuário da pecuária brasileira*. Instituto FNP, Itaim – SP, 2005. 340_p.

AX R.L., *et al.* Reprodução Animal 7^a ed. Barueri/SP: Manole, 2004. 513 p., Cap.26: Inseminação Artificial, p. 381-394.

BAKKER, J.; BAUM, M.J. Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators *Frontiers in Neuroendocrinology* v.21, p.220–262, 2000.

BALDASSARRE, H. & KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science* v. 82-83, p.255-266, 2004.

BARBAS, J.; GONÇALVES, S.C.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M. Efeito da aplicação de agentes dilatadores do cervix (misoprostol e sulfato de terbutalina) sobre os resultados da IA em

raças ovinas locais *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98 (548), p. 185-188, 2003.

BARBAS, J.; MASCARENHAS, R.D.; TAVARES, H.; CANNAS-SERRA, C.; CARDIGOS, L.; MOURA, R.; CANNAS SIMÕES, J.P. Efeito do tipo de diluidor e época de inseminação artificial em ovelhas da raça Saloia sobre a fertilidade, prolificidade e fecundidade *Proceedings do 3º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Porto, 6-8 Jul, p.387-392, 2001. Disponível em: <http://horta.0catch.com/aemh/ABST8.HTM#p100> Acesso em 04 junho 2007.

BARBOSA, J.A. É bom investir em ovinos. *Revista Brasileira de Caprinos e Ovinos*, Uberaba-MG, n. 80 p. 10-12, 2005.

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

BARRET, D.M.W.; BARTLEWSKI, P.M.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ultrassound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2 α given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology*, v.58, p.1409-1424, 2002.

BARRET, D.M.W., BARTLEWSKI, P.M., BATISTA-ARTEAGA, M., SYMINGTON, A., RAWLINGS, N.C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of the eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, v. 61, p.311-327, 2004.

BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; BECKERS'S, J.F.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination *Theriogenology* v.45, p.1553-1559, 1996.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P.; COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.113, p.275-285, 1998.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., COOK, S.J., CHANDOLIA, R.K., HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.115(1), p.111-124, 1999. ABSTRACT

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., CHAPMAN, C.L., NELSON, M.L., PALMER, B., AMAVINDAKSHAN, J., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. Ovarian responses in GnRH-treated anestrous ewes: follicular and endocrine correlates with luteal outcome. *Reproduction Fertility and Development* v.13, p.133-142, 2001.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe

lambs *Small Ruminant Research* v.43, p.37–44, 2002.

BARTLEWSKI, P. M.; ARAVINDAKSHAN, J.; BEARD, A. P.; NELSON, M. L. BATISTA-ARTEAGA, M. S.; COOK, J.; RAWLINGS N. C. Effects of medroxyprogesterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes *Animal Reproduction Science*, v.81 (1-2), p.63-75, 2004

BEAL, W. E. Application of knowledge about corpus luteum function in control of estrus and ovulation in cattle. *Theriogenology* v.45, p.1399-1411, 1996.

BICUDO, S. D.; SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas suffolk. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p. 473-474, 2003.

BINELLI, M., HAMPTON, J., BUHI, W.C., THATCHER, W.W. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biology of Reproduction* v.61, p.127–134, 1999.

BOLAND, M.P., KELLEHER, D., GORDON, I. Comparison of control of oestrus and ovulation in sheep by an ear implant (SC-21009) or by intravaginal sponge (cronolone or MAP). *Animal Reproduction Science*, v.1, p.275–81, 1979.

BRANDÃO, F.Z.; CAVALCANTI, A.S.; PINA, A.E.; VIANNA J.H.M.; BORGES A.M.; SILVA, A.L.S.; NOGUEIRA, L.A.G.; FONSECA, J.F. *Effect of reuse the implants of progesterone on the moment and number of ovulations in sheep* Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais ...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007.

BOSCOS, C.M.; SAMARTZI, F.C.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANAKIS, A.; KRAMBOVITIS, K. Use of progestagen-gonadotropin treatments in estrus synchronization of sheep *Theriogenology* v.58, p.1261-1272, 2002

BOUKHIQ, R., GOODMAN, R.L., BERRIMAN, S.J., ADRIAN, B., LEHMAN, M.N., A subset of gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine medial basal hypothalamus is activated during increased pulsatile lutenizing hormone secretion. *Endocrinology* v.140, p.5929–5936, 1999.

BREITBART, H., COHEN, G., RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction *Reproduction* v.129, p.263–268, 2005.

CAMPBELL, J.; HARVEY, T.; MCDONALD, M.; SPARKSMAN, R. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, v. 45, p.1535-1544, 1996.

CARDENAS, H.; McCLURE, K.E.; POPE, W.F. Luteal function and blastocyst development in ewes following treatment with PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology*, v.40, p.856-872, 1993.

CARDWELL, B. E.; FITCH, G. Q.; GEISERT, R. D. Ultrasonic evaluation for

the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by pregnant mare's serum gonadotropin. *Journal of Animal Science* v.76, p.2235–2238, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CERNA, C.; PORRAS, A.; VALENCIA, M.J.; PERERA, G.; ZARCO, L. Effect of an inverse subtropical (19°13N) photoperiod on ovarian activity, melatonin and prolactin secretion in Pelibuey ewes *Animal Reproduction Science* v.60, p. 511–525, 2000.

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* v.168, p.697-698, 1951.

CHANG, M.C. The Meaning of Sperm Capacitation: A Historical Perspective *Journal of Andrology* v.5, p.45-50, 1984.

CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., DELGADILLO, J.A., GUÉRIN, Y., RAVAUULT, J.P., THIMONIER, J., PELLETIER, J. Control of sheep and goats reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science* v.30, p.157–184, 1992. ABSTRACT

CHRISTENSON RK. Effect of short-term progestagen treatment on induction of estrus and lambing in anestrus ewes. *Journal of Animal Science*, v.43, p.795-801, 1976.

CLINE, M. A.; RALSTON, J. N. ; SEALS, R. C.; LEWIS, G. S. Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or P.G. 600 to estrus and ovulation in ewes *Journal of Animal Science* v.79, p.589-594, 2001.

COELHO, L.A.; RODRIGUES, P.A.; NONAKA, K.O.; SASA, A.; BALIEIRO, J.C.C.; VICENTE, W.R.R.; CIPOLLA-NETO, J. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. *Journal Pineal Research*, v.41, p.101-107, 2006.

COHEN, G., RUBINSTEIN, S., GUR, Y., BREITBART, H. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation *Developmental Biology*, v.267 (1), p.230-241, 2004.

CORDEIRO, P.C. Sincronização de Cio em Cabras Leiteiras Com Fotoperiodismo Artificial In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Curitiba, 1992.

CUNHA, E.A.; BUENO, M.S.; SANTOS, L.E.; VERÍSSIMO, C.J. *Produção Ovina* Nova Odessa – SP: Ed. Instituto de Zootecnia, 2002. 52 p.

DANIEL, J.A.; STERLE, S.W.; MCFADIN-BUFF, E.L.; KEISLER, D.H. Breeding ewes out-of-season using melengestrol acetate, one injection progesterone, or

a controlled internal drug releasing device *Theriogenology*, v.56, p.105-110, 2001.

DURÁN DEL CAMPO, A. E DURÁN DEL CAMPO, G. Descripción de un ensayo para adelantar la parición en Corriedale mediante inseminación artificial y la administración combinada de progesterona y PMS. *Revista de Medicina Veterinaria, Uruguay* v.55, p.7-23, 1955.

DELIGIANNIS, C., VALASI, I., REKKAS, C.A., GOULAS, P., THEODOSIADOU, E., LAINAS, T., AMIRIDIS, G.S. Synchronization of Ovulation and Fixed Time Intrauterine Insemination in Ewes. *Reproduction in Domestic Animals* v.40, p. 6-10, 2005.

DEVESON, S.L., ARENDT, J., FORSYTH, I.A. The influence of the pineal gland and melatonin on the reproductive performance of domesticated female ungulates. *Animal Reproduction Science* v.30, p.113–134, 1992.

DIXON, A.B.; KNIGHTS, M.; PATE, J.L.; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K. Reproductive performance of ewes after 5-day treatment with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of prostaglandin F₂α. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.142-148, 2006.

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

DUGGAVATHI, R; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Luteogenesis in Cyclic Ewes: Echotextural, Histological, and Functional Correlates *Biology of Reproduction*, v.69, p.634-639, 2003.

EVANS, A.C.O.; MAXWELL, W.M.C. *Salomon's artificial insemination of sheep and goats*. 1. ed. Sydney: Butterworths, 1987. 194 p.

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

EVANS A.C.O., FLYNN J.D., QUINN K.M., DUFFY, P., QUINN, P., MADWICK, S., CROSBY, T.F., BOLAND, M.P., BEARD, A.P. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes *Theriogenology* v.56, p.923-936, 2001.

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

EVANS A.C.O. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reproduction in Domestic Animals* v.38, p.240-246, 2003b.

FAIR, S.; HANRAHAN, J.P.; O'MEARA, C.M.; DUFFY, P.; RIZOS, D.; WADE, M.; DONOVAN, A.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial

insemination *Theriogenology* v.63, p.1995–2005, 2005.

FERNANDES, C.A.C., FIGUEIREDO, A.C.S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.406-414, 2007.

FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, v.45, p.1295-1325, 1996.

FLINT, A.P.F.; SHELDRIK, E.L.; THEODOSIS, D.T.; WOODING, F.B.P. Ovarian peptides: role of luteal oxytocin in the control of estrous cyclicity in ruminants. *Journal Animal Science*, v.62 (suppl 2), p.62-71, 1986.

FLYNN, J.D., DUFFY, P., BOLAND, M.P., EVANS, A.C.O. Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs *Animal Reproduction Science* v.62, p.285-296. 2000.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; SANTOS, I.C.C., VIANA, J.H.M.,MAGALHÃES, A.C.M. Induction of estrus in non-lactating dairy goats with different estrous synchrony protocols. *Animal Reproduction Science*, v. 85, p.117-124, 2005a.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.16, p.1-9, 2005b.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. Reprodução Assistida em Pequenos Ruminantes *Revista Ciência Agrária* n.43, jun. / jul. Suplemento, 2005c.

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

GIL, J.; OLIVEIRA, J.; MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Effect of GnRH associated with the application of timed artificial insemination in ewes *Reproduction, Fertility and Development* , v.16, p.507, 2004. ABSTRACT

GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W.M. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9 (5), p.481-7, 1997.

GINTHER O.J., KOT K., WILTBANK M.C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrus cycle in ewes. *Theriogenology*, v.43, p. 689-703, 1995.

GINTHER O.J., WILTBANK M.C., FRICHE F.M., GIBBONS J.R., KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses *Animal*

Reproduction Science v. 60–61, p.61–79, 2000.

GODFREY, R.W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of estrous synchronization of hair sheep in the tropics *Animal Reproduction Science* 47, 99-106, 1997.

GOLDMAN, B.D. The circadian timing system and reproduction in mammals *Steroids*, v.64, p. 679–685, 1999.

GONZALEZ-BULNES, A.; SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth *Animal Reproduction Science* v.84, p.107–119, 2004.

GOODMAN, R.L., KARSH, F.J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*, v.107, p.1286-1290, 1980.

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

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

GREYLING, J.P.C.; KOTZÉ, W.F.; TAYLOR, G.J.; HAGENDIJK, W.J.; CLOETE, F. Synchronization of oestrus in sheep: Use of different doses of progestagen outside the normal breeding season (Short communication) *South African Journal of Animal Science* v.24 (1), p.33, 2004.

HALBERT, G.; DOBSON, H.; WALTON, J.; BUCKRELL, B. A technique for transcervical intrauterine insemination in ewes. *Theriogenology*, v.33, p.993-1010, 1990a.

HALBERT, G.; DOBSON, H.; WALTON, J.; SHARPE, P.; BUCKRELL, B. Field evaluation of a technique for transcervical intra-uterine insemination of ewes. *Theriogenology*, v.33, p.1231-1243, 1990b.

HARESIGN, W. The effect of implantation of lowland ewes with melatonin on the time of mating and reproductive performance. *Animal Production* v.54, p.31–39, 1992.

HAWK HW, CONLEY HH. Loss of spermatozoa from the reproductive tract of the ewe and intensification of sperm breakage by progestagen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.27, p.339-347, 1971.

HILL, J.R.; THOMPSON, J.A.; PERKINS, N.R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey *Theriogenology* v.49, p.697-709, 1998.

HOMANICS, G.E.; SILVIA, W.J. Effects of progesterone and estradiol-17 β on uterine secretion of prostaglandin F $_{2\alpha}$ in response to oxytocin in ovariectomized ewes. *Biology of Reproduction* v.38, p.804-811, 1988.

HUNTER, M.G., Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum.

Journal of Reproduction and Fertility v.43, p.91-99, 1986.

HUSEIN, M.Q; KRIDLI, R.T. Effect of Progesterone Prior to GnRH-PGF₂α Treatment on Induction of Oestrus and Pregnancy in Anoestrous Awassi Ewes *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, p.228–232, 2003.

IIDA, K.; KOBAYASHI, N.; KOHNO, H.; MIYAMOTO, A.; FUKUY, Y. A comparative study of induction of estrus and ovulation by three different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season *Journal of Reproduction and Development*, v.50 (1), p.63-69, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA*. Censo Agropecuário. Apresenta efetivo de animais por tipo de rebanho. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 06 novembro 2007.

JABLONKA-SHARIFF A.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, v.133, p.1871, 1993.

JAINUDEEN M.R., WAHID H., HAFEZ E.S.E. *Reprodução Animal* 7ª ed. Barueri/SP: Manole, 513 p. Cap.12: Ovinos e Caprinos, p. 173-182, 2004

JOHNSON, W. L.; BARROS, N. N.; DE OLIVEIRA, E. R.; SIMPLICIO, A. A.; RIERA G., G. S. Dietary energy levels and age and weight at puberty in Morada Nova ewe-lambs, in Northeast Brazil *Small Ruminant Research*, v. 1, p.67-72, 1988. ABSTRACT

JOHNSON, S.K.; DAILEY, R.A.; INSKEEP, E.K.; LEWIS, P.E. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes *Domestic Animal Endocrinology*, v.13(1), p.69-79, 1996.

KLEEMANN D.O.; GROSSER T.I.; WALKER, S.K. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: aspects of management *Theriogenology*, v. 65, issue 8, p.1649-1665, 2006.

KNIGHTS,M., MAZE, T. D., BRIDGES P. J., LEWIS P. E. AND INSKEEP E. K. Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrous ewes *Theriogenology*, v.55, p.1181-1191, 2001.

KNIGHTS,M., HOEHN, T., LEWIS P. E. AND INSKEEP E. K. 2001. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrous ewes. *J. Anim. Sci.*, 79: 1120-1131.

KOBAYASHI, S., MIYAMOTO, A., BERISHA, B., SCHAMS, D., Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F₂ and progesterone secretion by bovine corpora lutea in vitro. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, v. 63, p.79–92, 2001.

KÖPPEN, W. *Climatologia*. Panamericana, Buenos Aires, 1948, 478p.

KRIDLI, R.T.; HUSEIN, M.Q.; HUMPHREY, W.D. Effect of royal jelly and GnRH on the estrus synchronization and pregnancy rate in ewes using intravaginal sponges *Small Ruminant Research* v.49, p.25–30, 2003.

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

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

LEWIS, P.E., BOLT, D.J., INSKEEP, E.K. Pattern of luteinizing hormone release in progestin-treated ewes. *Journal of Animal Science*, v.34, p.1204-1209, 1974.

LIU, X., HART E.J., DAI, Q., RAWLINGS, N.C., PIERSON, R.A., BARTLEWSKI, P.M. Ultrasonographic image attributes of non-ovulatory follicles and follicles with different luteal outcomes in gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-treated anestrous ewes. *Theriogenology* v.67, p.957–969, 2007.

LOPEZ-SEBASTIAN A, GONZALEZ DE BULNES A, SANTIAGO MORENO J, GOMEZ-BRUNET A, TOWNSEND EC, INSKEEP EK Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Paris ewes. *Animal Reproduction Science* v.48, p.279–291, 1997.

LUCIDI,P.; BARBONI,B.; MATTIOLO,M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep *Theriogenology*, v. 55, p. 1797-1805, 2001.

LUTHER J.S., GRAZUL-BILSKA A.T., KIRSCH J.D., WEIGL R.M., KRAFT K.C., NAVANUKRAW C., PANT D., REYNOLDS L.P., REDMER D.A. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Research*, v.72, p.227-231, 2007.

LYMBEROPOULOS, A.G.; AMIRIDIS, G.S.; KÜHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; CHRISTODOULOU, V.; VAINAS, E.; BREM, G. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination *Theriogenology*, v.55 (9),p.1855-1862, 2001.

MARTIN G.B.; MILTON J.T.B.; DAVIDSON R.H.; BANCHERO HUNZICKER G.E.; LINDSAY D.R.; BLACHE D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants *Animal Reproduction Science* v.82-83, p.231-45, 2004.

MARTINEZ-GARCIA, J.A.; SANCHEZ-TORRES, M.T.; CORDERO, J.L.; MENDOZA, G.D.; GARCIA-BOJALIL, C.M.; GARCIA-WINDER, M. Ovarian follicular dynamics after cauterization of the dominant follicle in anestrous ewes. *Animal Reproduction Science* v.98, p.225–232, 2007.

Mc Cracken JA, CARLSSON JC, GLEW ME, GODING JR, BAIRD DT, GREEN K., SAMUELSON B. Prostaglandin F₂α identified as luteolytic hormone in the sheep *Nature* v.37, p.135-138, 1972.

Mc DONALD, L. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária* 6 ed. Rio de Janeiro: Koogan, 1992. 997p. Cap. 34: Hormônios da Hipófise, p.464-473.

Mc LEOD, B.J.; HARESIGN, W. Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.71, p.381-386, 1984.

McNATTY, K.P., HEATH, D.A., HUDSON, N., CLARKE, I.J. Effect of long-term hypophysectomy on ovarian follicle populations and gonadotrophin-induced adenosine cyclic 3',5'-monophosphate output by follicles from Booroola ewes with or without the F gene. *Journal of Reproduction and Fertility* v.90, p.515-522, 1990.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on the length of the ovulatory cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.69-76, 2001.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*, v.58, p. 1713-1721, 2002.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* v.16, p. 403-413, 2004.

MIHM, M., BAGUISI, A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.102, p.123-130, 1994.

MIHM, M., CURRAN, N., HYTTLE, P., KNIGHT, P.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F., Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.116, p.293-304, 1999.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 45, p.1327-1350, 1996.

MOBINI S., HEATH A.M., PUGH D.G. *Sheep and Goat Medicine* Pennsylvania – Estados Unidos: W.B. Saunders Company, 2002. 468p. Cap.6: Theriogenology of Sheep and Goats, p. 129-196.

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

MINTON, J.E., COPPINGER, T.R., SPAETH, C.W. Poor reproductive response of anestrus Suffolk ewes to ram exposure is not due to failure to secret

lutinizing hormone acutely. *Journal of Animal Science*, v.69, p.3314-3320, 1990.

MUKASA-MUGERWA, E., EZAZ, Z., VIVIANI, P. Plasma concentration of progesterone during oestrous cycles of Ethiopian Menz sheep using radioimmunoassay. *Small Ruminant Research* v.3, p. 57-62, 1990.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M., BLACHE, D., MARTIN, G.B., SCARAMUZZI, R.J. Folliculogenesis and the ovarian expression of mRNA for aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* v.124, p.721-731, 2002.

MURDOCH, W.J., VAN KIRK, E.A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in follicular phase. *Endocrinology*, v.139, p.3480-3484. 1998.

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

NAQVI, S.M.K., PANDEY, G.K., GAUTAM, K.K., JOSHI, A., GEETHALAKSHMI, V., MITTAL, J.P. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds *Animal Reproduction Science* v.85, p.337-344, 2005.

NEPHEW KP, CARDENAS H, MCCLURE KE, OTT TL, BAZER FW, POPE WF. Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. *Journal of Animal Science*, v.72, p.453-8, 1994.

NOEL B, BISTER JL, PIERQUIN B, PAQUAY R. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology*, v.41, p.719-727, 1994.

NOTTLE, M.B.; KLEEMANN, D.O.; SEAMARK, R.F. Effect of previous undernutrition on the ovulation rate of Merino ewes supplemented with lupin grain, *Animal Reproduction Science*, v.49, p. 29-36, 1997.

NOËL, B.; MANDIKI, S.M.N.; PERRAD, B.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. Terminal follicular growth, ovulation rate and hormonal secretion after melatonin pretreatment prior to FGA-PMSG synchronisation in Suffolk ewes at the onset of the breeding season *Small Ruminant Research*, v.32, p. 269-277, 1999.

O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M. P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science* 68: 299-314, 1999.

OLIVEIRA, J.; GIL, J.; MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Effect of PGF₂ α dose on the reproductive response of a timed artificial insemination protocol in sheep *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.507, 2004. ABSTRACT

PADULA, A.M. GnRH analogues—agonists and antagonists *Animal*

Reproduction Science v.88, p.115–126, 2005.

PANT, H.C., HOPKINSON, C.R.N., FITZPATRICK, R.J. Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. *Endocrinology*, v.73, p.247-255, 1977.

PATE, J.L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum *Theriogenology* v.45, p.1361-1397, 1996.

PEARSE, B. H. G.; MCMENIMAN, N. P.; GARDNER, I. A. Influence of body condition on ovulatory response to lupin (*Lupinus angustifolius*) supplementation of sheep *Small Ruminant Research*, v.13, p.27-32, 1994. ABSTRACT

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

PIERSON, J.T.; BALDASSARRE, H.; KEEFER, C.L.; DOWNEY, B.R. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats *Theriogenology*, v.60, p.397-406, 2003.

PORTO FILHO, Roberto Mendes. *Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas*. São Paulo, 2004. 99f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PROSPERI, C.P.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V. Indução do estro em cabras Saanen nulíparas, utilizando-se diferentes tempos de exposição ao progestágeno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.481-483, 2003.

RAVINDRA, J.P.; RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; ADAMS, J.P. Ultrasonic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.101, p. 501-509, 1994.

REVAH, I., BUTLER, W.R., Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* v.106, p.39–47, 1996.

REYNA, J., THOMSON, P.C., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Synchrony of Ovulation and Follicular Dynamics in Merino Ewes Treated with GnRH in the Breeding and Non-breeding Seasons. *Reproduction in Domestic Animals* v.42, p.410–417, 2007.

RHIND, S. M. ; LESLIE, L. D. ; GUNN, R.G. & DONEY, J. M. Plasma FSH, LH, prolactin, and progesterone profiles of Cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, associated effects on reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, v.8, p.301-313, 1985. ABSTRACT

ROBERTS AJ, DUNN TG, MURDOCH WJ Induction of ovulation in proestrous

ewes: identification of the ovulatory follicle and functional status of the corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology* v.2, p.207–210, 1985.

ROBERTSON, H.A. *Reproduction in Domestic Animals* 3^a ed. 665p. Cap.18 Reproduction in the ewe and the goat, p.475-498, 1977.

ROBINSON, T.J., QUINLIVAN, T.D., BAXTER, C. The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* v.17, p.471-483, 1986.

RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; NONAKA, K.O.; SASA, A; VICENTE, W.R.R.; BALIEIRO, J.C.C.; SIQUEIRA, E.R. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under subtropical conditions *Scientia Agricola*, v.64, n.5, p.468-475, 2007.

RODRIGUEZ-IGLESIAS, R.M., CICCIONI, N.H., IRAZOQUI, H. Ram-induced reproduction in seasonally anovular Corriedale ewes: MAP doses for oestrous induction, ram percentages and post-mating progestagen supplementation. *Animal Science* v.64, p.119-125, 1997.

ROSA, H.J.D.; SILVA C.C.; BRYANT, M.J. The effect of paddock size on the response of seasonal anoestrous ewes to the ram effect *Small Ruminant Research* v.48, p.233–237, 2003.

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

RUBIANES, E.; BEARD, A.; DIERSCHKE, D.J.; BARTLEWSKI, P.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF₂α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes *Theriogenology*, v. 48 (7), 1093-1104, 1997b.

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

RUBIANES E. *Nociones Básicas da Fisiologia Reprodutiva em Cabras y Ovejas*. p.255-282 NOCIONES BÁSICAS DE FISILOGIA REPRODUCTIVA EN CABRAS Y OVEJAS, São Paulo. Anais...Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: USP, 2000a.

RUBIANES E. *Control Farmacológico del Ciclo Estral em Caprinos y Ovinos*. p.283-305. In CONTROL FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTARL EM RUMINANTES, São Paulo. Anais...Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: USP, 2000b.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F₂α. *Animal Reproduction Science* v.78,

p.47-55, 2003.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R. Perspectivas de la investigación sobre reproducción ovina en América Latina en el marco de las actuales tendencias productivas *Archivo Latinoamericano de Producción Animal* v.10 (2), p.117-125, 2002.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; GIL, J.; OLIVEIRA, J. Reproductive performance of a new timed artificial insemination protocol (Synchrovine™) in sheep. *Reproduction, Fertility and Development* , v.16, p.508, 2004. ABSTRACT

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

SALOMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen *Animal Reproduction Science* v. 62, p.77-111, 2000.

SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants *Small Ruminant Research* v.43, p.53-64, 2002.

SASA, A. ; TESTON, D. C. ; RODRIGUES, P. A. ; COELHO, L. A. ; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas durante o período de abril a novembro no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science*, v. 31, n. 3, p. 1150-1156, 2002.

SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; NAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; McNATTY, K.P.; McNELLY, A.S.; TSONIS, C.G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development* v.5, p.459-478, 1993.

SCHIEWE, M.C.; HOWARD, J.G.; GOODROKE, K.L.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2 α synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* , v.34, p.469-486, 1990.

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

SHAHNEH, A.Z.; TAJANGOOKEH, H.D.; PANAH, H.S.; SAKI, A.A. Effect of Controlled Internal Drug Release Device Treatment Duration and eCG Dose on Reproductive Performance of Seasonally Anestrous Fat-tailed Iranian Ewes *Pakistan Journal of Biological Sciences* v.9 (8), p.1552-1555, 2006.

SHANGA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.43, p. 53-64, 2002.

SHARMA, R.K.; SHARMA, M. Corpus luteum spurium of goats. *Indian Journal*

of Animal Science, v.68, n.2, p.150-152, 1998.

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F.; RIERA, G.S.; FOOTE, W.C. Idade, Peso e Taxa de Ovulação à Puberdade em Ovinos Deslanados no Nordeste do Brasil *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.23, n.3, p.271-283, 1988 ABSTRACT

SILVIA, W.J.; RAW, R.E.; ALDRICH, S.L.; HAYES, S.H. Uterine secretion of prostaglandin F_{2α} in response to oxytocin in ewes: Changes during the estrous cycle and early pregnancy. *Biology Reproduction*, v.46, p.1007-1015, 1992.

SILVIA, W.J. The role of uterine and ovarian hormones in luteolysis: a comparison among species. *Reproduction Domestic Animal*, v.34, p.317-328, 1999.

SIMONETTI, L.; RAMOS, G.; GARDÓN, J.C. Estrus presentation and distribution in ewes treated with intravaginal sponges impregnated with medroxiprogesterona acetate (MAP) in combination with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.5, p.00-00, 1999.

SIMPLÍCIO, A.A. Visão de Futuro ou Miopia Técnico-Científica. *Revista Brasileira de Caprinos e Ovinos*, Uberaba-MG, agosto 2005. n. 80 p. 31.

SIMPLÍCIO, A.A.; SIMPLÍCIO, K.M.M.G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: desafios e oportunidades. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, n.39, p.7-18, 2006.

SMITH, P.L.; BOUSFIELD, G.R.; KUMAR, S.; FIETE, D.; BAENZIGER, J.U. Equine lutropin and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc and Siaα2,3Gal, respectively, *Journal Biology Chemical*, v.268, p.795-802, 1993.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* v.39, p.308–317, 1988. ABSTRACT

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dynamics. *Endocrinology* v.127, p.916-925, 1990.

SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biology of Reproduction* v.56, p.483-488, 1997.

SUITER, J. 1994. *Body condition scoring in sheep and goats*. *Farmnonte* 69/94. Disponível em: http://www.agric.wa.gov.au/content/aap/sl/m/fn069_1994.htm Acesso em 23 de julho de 2007.

TAKADA, LUCIANA Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolos de curta duração em ovelhas da raça

Suffolk. 2004 Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S.M.; BARTOLOME, J.A.; SANTOS, J.E. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology* v.23, p.243–54, 2002.

THEODOSIS, D.T.; WOODING, F.B.P.; SHELDRIK, E.L.; FLINT, A.P.F. Ultrastructural localization of oxytocin and neurophysin in the ovine corpus luteum. *Cellular Tissue Research*, v.243, p. 129-135, 1986.

TRALDI A.S. *Controle Farmacológico do Ciclo Estral e da Superovulação em Caprinos e Ovinos*. In CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTARL EM RUMINANTES, 1, 2005, São Paulo. Anais...Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: USP, 2000.

TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F₂ α induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biology Reproduction*, v.57, p.1016-1022, 1997.

UCAR,O.; KAYA, M.; YILDIZ, S.; ONDER, F.; CENESIZ, M.; UZUN, M. Effect of Progestagen/PMSG Treatment for Oestrus Synchronization of Tuj Ewes to be Bred after the Natural Breeding Season *Acta Vet. BRNO* v. 74, p.385–393, 2005.

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Estrus response to the ram effect in Corriedale ewes primed with medroxyprogesterone during the breeding season *Small Ruminant Research* v.32, p.89-91, 1999a. Technical Note

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus *Animal Science*, 68, 349-353, 1999b.

VALLET, J.L.; LAMMING, G.E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *Journal Reproduction and Fertility*, v.90, p.625-634, 1990.

VALVERDE, C.C. *250 Maneiras de preparar rações balanceadas para ovinos*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. 180p.

VAN CLEEFF, J.; KARSH, F.J.; PADMANABHAN, V. Characterization of the endocrine events during the peri-estrous period in sheep after synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domestic Animal Endocrinology* v.15, p.23-34, 1998.

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

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of

long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* v.55, p.993-1004, 2001.

VIÑALES Carolina. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Uppsala, 2003. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Clinical Chemistry.

WATHES, D.C. Embryonic mortality and the uterine environment *Journal of Endocrinology* v.134, p.321 – 325, 1992.

WEBB, R.; DUGGAN, K.; QUINN, R.L.; FOULADI-NASHTA, A.A.; HUNTER, M.G. Desenvolvimento folicular em espécies mono e poli-ovulatórias: do feto à fertilização *Acta Scientiae Veterinariae* v.34 (1), p.95-114, 2006.

WHEATON J.E.; CARLSON, K.M.; WINDELS, H.F.; JOHNSTON, L.J. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats *Animal Reproduction Science*, v. 33 (1-4), p.127-141, 1993.

WILDEUS, S.; COLLINS, J.R. Fertilization failure after timed AI in sheep and goats using eCG/hCG following synchronization with MAP sponges *Reproduction, Fertility and Development* , v.16, p.509, 2004. ABSTRACT

WILTBank, M. C.; NISWENDER G. D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants *Animal Reproduction Science*, v.28, p.103-138, 1992. ABSTRACT

XU, Z.Z.; MCDONALD, M.F.; MCCUTCHEON, S.N. The effects of nutritionally induced liveweight difference on follicular development, ovulation rate, oestrus activity and plasma follicle stimulation hormone levels in the ewe. *Animal Reproduction Science*, v.19, p. 67-78, 1989. ABSTRACT

ZARKAWI, M. Monitoring the reproductive performance in Awassi Ewes using progesterone radioimmunoassay *Small Ruminant Research* v. 26, p. 291-294, 1997. Technical Note

Zelege, M.; Greyling, J.P.C.; Schwalbach, L.M.J.;Muller, T.;Erasmus, J.A. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period *Small Ruminant Research* v.56, p.47-53, 2005.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Parâmetros climatológicos avaliados durante o período do experimento

Período	Temperatura do Ar** (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Precipitação Pluviométrica (mm ³ /últimas 24h)	Umidade Relativa do Ar(%)
12/jan	26	32	22	0	não tem
13/jan	27	33	22	0	não tem
14/jan	27	33	22	0	75
15/jan	27	33	22	0	65
16/jan	26	34	22	0	65
17/jan	27	33	21	0	65
18/jan	28	33	22	não tem	65
19/jan	27	33	21	0	70
20/jan	27	33	22	0	65
21/jan	27	34	22	0	65
22/jan	29	35	22	0	65
23/jan	29	36	21	0	60
24/jan	30	36	23	0	65
25/jan	29	37	24	0	65
26/jan	30	38	25	0	70
27/jan	27	36	24	40.9	80
28/jan	25	33	22	27.8	85
29/jan	26	não tem	não tem	não tem	não tem
30/jan	26	32	22	não tem	80
31/jan	29	não tem	24	0	não tem
1/fev	26	33	22	3.2	80
2/fev	26	30	23	0	85
3/fev	27	33	22	0	75

ANEXO 2 Parâmetros avaliados para determinação do escore da condição corporal

Escore	Espinha dorsal	13ª Costela	Garupa
1	Proeminente e pontuda	O final é pontiagudo e fácil sentir os espaços entre, sobre e envolta das costelas	Fina, a superfície tende a ser côncava
2	Proeminente mas macia	Final macio e arredondado; pode-se sentir os espaços entre, sobre e envolta das costelas amaciados	Razoavelmente profunda com a superfície tendendo a ser plana
3	Pode ser sentida mas macia e arredondada	Final arredondado e com boa cobertura, uma pressão firme é necessária para sentir os espaços entre e abaixo das costelas	Repleta e arredondada
4	Detectável com pressão	Com pressão firme as costelas podem ser sentidas individualmente	Repleta e com uma camada de cobertura de gordura
5	Pode ser sentida com pressão firme	Não podem ser sentidas, nem mesmo com firme pressão	O músculo não pode ser sentido devido a uma espessa camada de gordura

Fonte: Suiter, 2004.

ANEXO 3 Dados das avaliações de peso e escore da condição corporal das ovelhas antes do experimento

OVELHA	ESCORE	PESO (KG)	OVELHA	ESCORE	PESO (Kg)
1	2,75	-	40	3,75	45,0
1	3,00	41,5	41	2,75	32,5
2	3,25	-	43	2,50	38,1
3	2,75	-	45	2,50	39,0
5	3,00	42,0	46	3,25	34,5
6	3,50	-	47	3,50	35,5
6	3,75	49,0	49	2,75	43,8
8	2,75	45,0	60	3,00	52,0
8	2,75	-	63	3,25	40,8
9	3,25	-	64	3,50	44,4
10	3,75	39,5	65	3,00	53,0
10	4,00	-	66	3,00	36,7
11	3,25	41,7	69	3,00	34,3
12	3,25	-	70	3,25	41,0
13	3,75	42,2	71	3,25	37,7
14	3,25	48,1	82	3,00	-
14	3,25	-	86	2,50	-
15	3,50	-	142	3,25	-
16	2,75	-	153	2,75	-
16	3,75	30,5	d11	2,75	56,90
18	2,75	-	d16	3,25	55,00
18	3,75	33,3	d25	2,25	39,00
20	3,75	30,5	d26	3,50	44,00
21	3,00	34,5	d28	3,75	46,30
23	3,25	43,3	d41	4,00	51,30
24	2,50	40,6	d43	4,00	44,00
26	3,50	36,6	d46	3,75	30,50
27	2,75	39,0	d48	4,50	65,00
28	3,00	30,4	d48b	4,50	53,60
29	3,50	38,0	d49	3,75	39,00
30	2,75	32,2	d63	3,00	30,80
35	3,00	33,6	dgigante	5,00	79,40
38	3,25	37,3	sb/38	3,25	29,0

ANEXO 4 Fórmula do concentrado oferecido às ovelhas

Componente	Percentual	Quantidade
PGP – D`AVITA	17%	50Kg
Milho Moído	20%	60Kg
Trigo	30%	90Kg
Soja / Algodão	17%	50Kg
Cevada / Refinazil	11%	33Kg
Sal Mineral	3%	9Kg
Sal Mossoró	1%	3Kg
Calcário	1%	3Kg
Uréia	Até 1%	2Kg
TOTAL	100%	300Kg

ANEXO 5 Composição do sal mineral oferecido às ovelhas

Composição / Kg	
MACRONUTRIENTES	
Cálcio %	135
Fósforo %	7,5
Sódio (g/Kg)	158
Magnésio (g/Kg)	8
Enxofre (g/Kg)	6
Potássio (g/Kg)	0
MICRONUTRIENTES	
Cobalto (mg/Kg)	60
Cobre (mg/Kg)	-
Iodo (mg/Kg)	60
Manganês (mg/Kg)	2500
Selênio (mg/Kg)	15
Zinco (mg/Kg)	3000
Ferro (mg/Kg)	3.500
VITAMINAS	
Vitamina A (UI/Kg)	250000
Vitamina D (UI/Kg)	100000
Vitamina E (UI/Kg)	500

ANEXO 7 Ficha para controle da ovulação

NÚMERO ANIMAL:

Ovário esquerdo

Ovário direito

Data: Hora:	Data: Hora:

ANEXO 8 Fórmula do diluente utilizado para diluição do sêmen e procedimentos do preparo

Ingredientes	Quantidades
I) Tris	3,634g
II) Frutose	0,50g
III) Ácido cítrico	1,99g
IV) Gema de ovo	14ml
V) Água destilada, deionizada e autoclavada	q.s.p. 100ml

Procedimentos

- Mistura-se os ingredientes I, II e III com cerca de 70 ml do ingrediente V;
- Acrescentam-se à mistura o ingrediente IV
- Completa-se o volume para 100 ml com o ingrediente V
- Após a homogeneização, distribui-se a solução em tubos plásticos estéreis de 50 ml, e armazena-os congelados até sua utilização, no máximo em 30 dias.

Fonte: EVANS; MAXWELL, 1987.

ANEXO 10 Dosagens de progesterona (ng/ml) de todas as ovelhas

Ovelhas	1	5	6	8	10	13	16	20	21	24	26	27	29
Dia 1	0,4	0,15	7,2	4,33	7,4	0,45	8,33	0,58	0,43	7,13	7,97	0,12	1,39
Dia 2	6,56	0,75	0,34	2,32	0,33	0,09	0,26	0,41	5,96	7,73	0,41	0,07	0,49
Dia 3	0,35	0,25	0,26	0,47	0,38	0,32	0,52	0,30	0,36	1,95	0,17	0,07	0,29
Dia 4	0,14	0,09	0,27	0,22	0,29	0,33	0,20	0,30	0,34	0,36	0,42	0,24	0,23
Dia 5	0,35	0,32	0,85	0,37	0,44	1,07	0,23	0,30	0,27	0,30	0,28	0,14	0,49