

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DINÂMICA FOLICULAR NO USO EM PROTOCOLOS DE
SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E SUPEROVULAÇÃO EM
OVELHAS SANTA INÊS**

Maria Emilia Franco Oliveira

Médica Veterinária

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Novembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DINÂMICA FOLICULAR NO USO EM PROTOCOLOS DE
SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E SUPEROVULAÇÃO EM
OVELHAS SANTA INÊS**

Maria Emilia Franco Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Co-orientador: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária - área de concentração: Reprodução Animal.

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Novembro de 2011

Oliveira, Maria Emilia Franco
O48d Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de
estro e superovulação em ovelhas Santa Inês / Maria Emilia Franco
Oliveira. -- Jaboticabal, 2011
xiii, 101f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca examinadora: Guilherme de Paula Nogueira, Cláudio
Alvarenga de Oliveira, Eunice Oba, Cesar Roberto Esper
Bibliografia

1. Emergência de onda folicular. 2. Ovulação. 3. Progesterona.
4. Embriões. 5. Ovinos. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA - filha de Zilmar Moraes de Oliveira e Suely Andrade Franco Oliveira, nascida em 22 de outubro de 1980, na cidade de Ituiutaba, Minas Gerais, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, em 13 de maio de 2005, na cidade de Belém - PA. Coordenou pesquisas no Centro de Pesquisa de Caprinos e Ovinos do Pará, pertencente à mesma universidade no período de junho de 2005 a fevereiro de 2006. Em março de 2006 ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração: Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", câmpus de Jaboticabal – Unesp, sob a orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, que foi concluído em fevereiro de 2008, período em que foi bolsista do CNPq. Em março de 2008, iniciou o curso de doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração: Reprodução Animal, pela mesma instituição. Em conjunto com o orientador, Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, aprovaram bolsa de estudo e projeto de auxílio pesquisa pela FAPESP.

Dedico,

Aos meus amados pais e irmãos,
que são minha fortaleza, meu exemplo
e por quem busco sempre fazer meu melhor.

"Se você não conseguir vencer pelo
talento vença pelo esforço"
(Maria Emilia, 1998)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu eterno protetor, que me mostra a cada dia a importância da fé. Obrigada por tuas bênçãos e por me mostrar nos pequenos detalhes a razão da vida, e a necessidade de viver feliz e intensamente cada momento.

Aos meus pais, **Zilmar Morais de Oliveira e Suely Andrade Franco Oliveira**, meus heróis, ..., meus amores. Obrigada por me permitirem viver em uma família tão unida, amorosa e feliz e, por todos os ensinamentos que me fizeram ser uma mulher com princípios, forte e dedicada. Paizim e Mãezinha, não foi e não será fácil abdicar do convívio diário, dos beijos e abraços apertados, de ouvir e falar: "SABIA QUE EU TE AMO??", mas isso me faz enxergar o quanto são especiais na minha vida e me faz hoje, olhar pra trás e ter orgulho de tudo que vivemos juntos. A escolha do caminho profissional que sigo hoje é certamente influenciada pela criação que recebi, pelo amor às coisas do campo que sempre tiveram. Sou feliz porque sei que sempre estarão ao meu lado me apoiando.

Aos meus queridos irmãos, **Rodrigo Franco Oliveira e Juliana Franco Oliveira**, que orgulhosamente fazem parte da minha vida. Obrigada por todo amor, carinho, proteção e ensinamentos, que os tornam também responsáveis por tudo que sou. Tê-los como irmãos me faz ainda mais forte, pela certeza que tenho ao meu lado, grandes amigos, grandes amores AMO MUITO VOCÊS!!

Aos meus **avós, tios, padrinhos, primos e "sobrinho"**, o meu muito obrigado por todo amor que sempre nos mantiveram unidos, superando as distâncias geográficas que há muitos anos nos separa, e que me faz desejar sempre reencontrá-los. Vocês estão sempre em meu pensamento e minhas

preces. Cada um de vocês tem um enorme espaço na minha vida e no meu coração. **AMO VOCÊS!!**

Ao meu amado noivo **Luís Guilherme de Oliveira**, que tem conquistado um grande espaço em meu coração. O doutorado proporcionou nosso encontro e durante esse tempo vivemos uma trajetória repleta de felicidade, amor, carinho, respeito e companheirismo. Agora confiamos um no outro o direito e a responsabilidade de formarmos uma família... que certamente será muito abençoada por Deus.... Rogo para que nosso lema perpetue: "*Sempre unidos e felizes*"... **EU TE AMO!!!**... Os meus agradecimentos se estendem à sua família que desde o primeiro momento me acolheu com tanto carinho.

Ao meu querido orientador, Professor **Wilter Ricardo Russiano Vicente**, agradeço pela amizade, confiança e apoio incondicional. Suas sábias palavras e carinhosas contribuíram imensamente para meu crescimento e encorajam-me a continuar empenhando-me ao máximo para enfrentar as batalhas da vida e conquistar novas oportunidades. **O MEU MUITO OBRIGADA!!!!**

Aos meus também especiais co-orientadores, Dr. **Jeferson Ferreira da Fonseca** e Professor **Sony Dimas Bicudo**. Uma das minhas metas do doutorado foi estreitar os laços dos nossos relacionamentos profissionais. Hoje posso assegurar que os reconhecimentos pelas destacadas carreiras que conduzem na reprodução dos pequenos ruminantes são mais que merecidos. Agradeço pela receptividade, presteza, confiança, apoio e ensinamentos que sempre me dispensaram.

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp**, em especial à **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** e ao Programa

de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar meu doutorado em uma renomada universidade.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio projeto que viabilizaram a execução desse estudo.

Aos Professores do departamento de Reprodução Animal: **Joaquim Mansano Garcia, Cesar Roberto Esper, Paulo Henrique Franceschini, Francisco Guilherme Leite, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e Gilson Hélio Toniollo**, que sempre me atenderam com tanta presteza. Obrigada por todos os ensinamentos que me transmitiram nas disciplinas e nas inúmeras conversas. Todos vocês foram, de modo especial, importantes para meu crescimento.

A todos os **professores da Unesp (FCAV e FMVZ) e USP (FMVZ)**, que tive o prazer de conviver, adquirir conhecimentos e dividir experiências durante disciplinas e outras oportunidades que surgiram nesse período de minha formação profissional.

À Professora **Eunice Oba**, meus sinceros agradecimentos por disponibilizar seu laboratório para a execução das dosagens hormonais desse estudo. O grau de envolvimento da senhora foi essencial e deixa-me ainda mais agradecida.

Ao Prof. **Pawel M. Bartlewski** meus sinceros agradecimentos pela pronta receptividade na "University of Guelph" (Canadá). Os ensinamentos transmitidos durante conversas e projetos executados contribuíram muito para meu aperfeiçoamento.

Aos **queridos colegas do Departamento de Reprodução Animal e amigos** conquistados desde o mestrado: Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida,

Edson de Aguiar, Isabel Aparecida Penharol Natarelli, Ana Paula Perini, Aline Costa de Lúcio, Naiara Zoccal Saraiva, Marcelo Barbosa Bezerra, Michelly Fernandes de Macedo, Danilas Salinet de Melo, Maria Carolina Miguel, Adriana Santana do Carmo, Juliana Corrêa Borges, Juliana Souza Pinto Pieroni, Cla Slade Oliveira, Letícia Zocolaro de Oliveira, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, Flávia Lopes Arnold, Dan Arnold, Cássia Orlandi, Kellen de Sousa Oliveira, Marina Ragnani Lima, Guilherme Fazan Rossi, Carla Cristina D'Amato, Tathiane Fergurson Motheo, Fábio Morato Monteiro, Alessandra Ranieri, Bruna Mazeti, Aracéle Elisane Alves, Maricy Apparicio Ferreira, Eliandra Pires, Paula Andressa Pennacchi Savi, Janaina Torres Carreira, Eveline Zanetti, Alanna Lima, Pedro Paulo Maia Teixeira, Felipe Farias Barros, Diogo José Cardilli e Marcus Rossi Feliciano, meu muito obrigada pelo convívio e alegria que tornaram nosso ambiente de trabalho tão agradável. As pessoas que já seguiram por novos caminhos deixam saudades... Complemento meus agradecimentos, de modo especial, a cada um pelas diversas colaborações em meus trabalhos. Agradeço ainda pelos inúmeros momentos de lazer de tivemos juntos.

A todos os **estagiários** do Departamento de Reprodução Animal que pude conviver e trocar experiências durante esses anos.

Aos **funcionários da FCAV-Unesp**, de modo especial os funcionário do Departamento da Reprodução Animal e do Hospital Veterinário, que sempre estiveram de prontidão para me auxiliar, possibilitando a execução desse estudo. Os agradecimentos se estendem aos **estudantes do Colégio técnico Agrícola** da FCAV-Unesp que tanto ajudaram. O MEU MUITO OBRIGADA!!!

Aos meus **Grandes Amigos** dos quatro cantos do Brasil e do mundo, que pude conquistar e cultivar durante minhas andanças, o meu muito obrigada por tudo. Sei que sempre me acompanham e apóiam mesmo de longe. Verdadeiras amizades não acabam com o tempo e a distância, são para a vida toda. Vocês estão no meu coração!

A minha querida amiga **Juliana Corrêa Borges Silva** que sempre demonstrou tanto carinho e atenção. Obrigada pelos momentos de intenso estudo, conversas sempre agradáveis, caminhadas relaxantes para a mente... Sua amizade é muito importante para mim!!!

A minha também especial amiga **Ana Paula Perini**, o meu muito obrigada por tudo.... Companheirismo e alegria são características marcantes em você... Foi muito especial caminhar lado a lado com você durante nosso doutorado.

Aos meus queridos amigos **Mabel Freitas Cordeiro, Roberta Machado Ferreira, Juliana Souza Pinto Pieroni, Juliana Silva Lopes, Ludmilla Bertonha de Martini, Samuel Figueiredo de Souza e Henderson Ayres** que conquistei durante o mestrado. Hoje apesar das distâncias que nos separa fisicamente, tenho a certeza que nossas amizades serão para a vida toda. Muito obrigada por todos os momentos de alegria, apoio e parceria, que podem ser resumidos com a palavra amizade.

Ao amigo **Henderson Ayres**, complemento meu agradecimentos pela presteza e empenho na execução da análise estatística de estudo. Obrigada pelo apoio e ensinamentos que sempre me ajudaram.

Aos amigos conquistados durante minha estadia em Guelph, meus sinceros agradecimentos pela acolhida e amizade que foram essencial durante

essa experiência. Foram momentos de muita felicidade, rogo poder dividir muitos outros com vocês.

Muito obrigada a todos! Que Deus os abençoe sempre!

"O que mais importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida."

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I - Referencial Teórico	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Múltipla ovulação e transferências de embriões	3
2.1.1 <u>Protocolos superovulatórios</u>	4
2.1.1.1 <i>Superestimulação gonadotrófica</i>	4
2.1.1.2 <i>Protocolos-base para superovulação</i>	7
2.1.1.3 <i>Indução da ovulação</i>	10
2.1.1.4 <i>Controle da regressão luteal precoce</i>	10
2.1.2 <u>Métodos de acasalamento</u>	11
2.1.3 <u>Colheita e avaliação de embriões</u>	12
3. JUSTIFICATIVA	14
CAPÍTULO II - <i>Dinâmica folicular e perfil hormonal em protocolos-base para superovulação, com ou sem a troca do dispositivo de progesterona, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro.....</i>	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	20
2.1 GERAL	20

2.2 ESPECÍFICOS	20
3. HIPÓTESE INICIAL	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Local do experimento	21
4.2 Animais	21
4.3 Grupos e Tratamentos	21
4.4 Avaliação ultrassonográfica	22
4.4.1 <u>Dinâmica Folicular</u>	24
4.5 Colheitas de sangue	27
4.6 Dosagem hormonal	27
4.7 Observações de estro	28
4.8 Análise Estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Dinâmica Folicular	29
5.1.1 <u>Número de ondas foliculares</u>	29
5.1.2 <u>Emergências de ondas foliculares</u>	30
5.1.3 <u>Padrão de crescimento do maior folículo de cada onda folicular</u> ...	37
5.1.4 <u>Onda ovulatória</u>	41
5.2 Progesterona	43
5.3 Manifestações de estro	51
5.4 Ovulações	52
6. CONCLUSÕES.....	52
 <i>CAPÍTULO III - Viabilidade da superovulação iniciada na emergência da primeira e última ondas foliculares, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro ...</i>	 54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. OBJETIVOS	58

2.1 GERAL	58
2.2 ESPECÍFICOS	58
3. HIPÓTESE INICIAL	59
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Local do experimento	59
4.2 Animais	59
4.3 Grupos e Tratamentos	60
4.4 Avaliação ultrassonográfica	64
4.5 Colheitas de sangue	65
4.6 Dosagem hormonal	65
4.7 Observações de estro e Monta natural	66
4.8 Colheita de embriões	66
4.9 Avaliação embrionária	68
4.10 Análise Estatística	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 Progesterona	70
5.2 População Folicular	75
5.3 Manifestações de estro	80
5.4 Resposta superovulatória e produção de embriões.....	80
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Soro albumina bovina
CIDR	“Controlled internal drug release”
CL	Corpo Lúteo
cm	Centímetros
D	Dia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FG	Folículo grande
FP	Folículo pequeno
FPO	Folículo pré-ovulatório
FSH	Hormônio folículo-estimulante
pFSH	Hormônio folículo-estimulante de origem suína
G	Gauge (medida de diâmetro de uma agulha)
g	Giros ou força centrífuga relativa
G-	Grupo
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Hora
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotrofina menopausal humana
i.e.	Isto é
i.m.	Intramuscular
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em tempo fixo
Kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
Máx	Máximo
mg	Miligramas

MHZ	Mega-Hertz
min	Minuto
Mín	Mínimo
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MOTE	Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
n	Número de animais por grupo
ng	Nanograma
nº	Número
°C	Graus Celsius
P4	Progesterona
PBS	Tampão fosfato tamponado
PGF2α	Prostaglandina F2α
pH	Potencial hidrogeniônico
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
S.E.M.	Erro padrão da média
SAS®	Statistical Analyses System
TdT	<i>Terminal deoxinucleotidyl Transferase</i>
TUNEL	In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay
UI	Unidade internacional
vs	<i>Versus</i>
X	Vezes
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo II - Dinâmica folicular e perfil hormonal em protocolos base para superovulação, com ou sem a troca do dispositivo de progesterona, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro

Tabela 1 - Grupos experimentais preconizados para ovelhas da raça Santa Inês submetidas a tratamento de sincronização do estro	23
Tabela 2 - Valores médios (\pm S.E.M.) dos dias de emergência das ondas foliculares durante protocolos hormonais de sincronização do estro, de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês (D0 – inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos).....	31
Tabela 3 - Valores médios (\pm S.E.M.) dos dias de emergência das ondas foliculares durante protocolos hormonais de sincronização do estro, de acordo com o <i>status</i> folicular no Dia 0 (inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos), em ovelhas da raça Santa Inês.....	32
Tabela 4 - Valores médios (\pm S.E.M.) para os dias de emergência das ondas foliculares, de acordo com o número de ondas foliculares que os animais apresentaram durante protocolos hormonais de sincronização do estro, em ovelhas da raça Santa Inês.....	33
Tabela 5 - Número de folículos de acordo com seus diâmetros nos dias próximos a emergência da primeira onda do protocolo hormonal, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade (Dia 0 = inserção	

do dispositivo CIDR; início dos protocolos hormonais de sincronização do estro).....	35
Tabela 6 - Número de folículos de acordo com seus diâmetros nos dias próximos a emergência da última onda do protocolo hormonal, em ovelhas da raça Santa Inês, nos grupos e períodos estacionais (Dia 0 = inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos hormonais de sincronização do estro).....	36
Tabela 7 - Valores médios (\pm S.E.M.) do diâmetro máximo do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.....	38
Tabela 8 - Valores médios (\pm S.E.M.) do diâmetro máximo do maior folículo de cada onda folicular de acordo com o número de ondas , em ovelhas da raça Santa Inês.....	39
Tabela 9 - Valores médios (\pm S.E.M.) do dia do diâmetro máximo do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês. (D0 – inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos).....	40
Tabela 10 - Valores médios (\pm S.E.M.) da duração do período de crescimento do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.....	40
Tabela 11 - Valores médios (\pm S.E.M.) da taxa de crescimento do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.....	41
Tabela 12 - Valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis relacionadas ao desenvolvimento do(s) folículo(s) ovulatório(s) de acordo com os grupos, períodos estacionais e <i>status</i> folicular ao início do protocolo, em ovelhas da raça Santa Inês. (D0 – inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos).....	42

Tabela 13 - Valores médios (\pm S.E.M.) para o intervalo, em horas, entre final dos protocolos hormonais de sincronização do estro (retirada do dispositivo – CIDR) e o início de estro de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês..	51
Tabela 14 - Valores médios (\pm S.E.M.) para momento ovulatório, número de ovulações, diâmetro ovulatório e intervalo entre início do estro e momento ovulatório de acordo com os grupos (protocolos hormonais de sincronização do estro) e períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.....	52

Capítulo III - Viabilidade da superovulação iniciada na emergência da primeira e última ondas foliculares, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro

Tabela 1 - Grupos experimentais preconizados para tratamentos de superovulação e colheita de embriões em ovelhas da raça Santa Inês.....	61
Tabela 2 - Classificação dos embriões quanto à qualidade.....	69
Tabela 3 – Valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis relacionadas a concentração sérica de progesterona (P4) nos dias de início (1° FSH) e término (8° FSH) do tratamento superestimulatório com FSH e momento da colheita de embriões de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) nos períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.....	74
Tabela 4 – Valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis relacionadas a concentração sérica de progesterona (P4) nos dias de início e	

	término do tratamento superestimulatório com FSH e momento da colheita de embriões de acordo com os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade) nos grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares), em ovelhas da raça Santa Inês.....	74
Tabela 5 –	Valores médios (\pm S.E.M.) e ocorrência nos animais para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) no período de anestro, em ovelhas da raça Santa Inês.....	76
Tabela 6 –	Valores médios (\pm S.E.M.) e ocorrência nos animais para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) no período de transição, em ovelhas da raça Santa Inês.....	77
Tabela 7 –	Valores médios (\pm S.E.M.) e ocorrência nos animais para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) no período de ciclicidade, em ovelhas da raça Santa Inês.....	78
Tabela 8 –	Valores médios (\pm S.E.M.) para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular entre os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.....	79
Tabela 9 –	Valores médios (\pm S.E.M.) para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório	

	com FSH iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular entre nos períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.....	79
Tabela 10 -	Valores médios (\pm S.E.M.) para o intervalo entre o final dos protocolos de superovulação (retirada do dispositivo – CIDR) e o momento do início do estro de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.....	80
Tabela 11 -	Distribuição da frequência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média \pm desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) por categoria, em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de anestro.....	81
Tabela 12 -	Distribuição da frequência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média \pm desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) por categoria, em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de transição.....	81
Tabela 13 -	Distribuição da frequência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média \pm desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) por categoria, em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de ciclicidade.....	82
Tabela 14 -	Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de anestro...	83

Tabela 15 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de transição.....	84
Tabela 16 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de ciclicidade.....	85
Tabela 17 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira onda folicular do tratamento, de acordo com os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade).....	86
Tabela 18 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da última onda folicular do tratamento, de acordo com os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade).....	87

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo II - Dinâmica folicular e perfil hormonal em protocolos base para superovulação, com ou sem a troca do dispositivo de progesterona, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro

- Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à sincronização do estro em ovelhas da raça Santa Inês, repetido nos períodos estacionais de anestro, transição, e ciclicidade..... 23
- Figura 2 - Imagens ultrassonográficas de ovários em ovelhas, destacando-se: (A) folículos pequenos (2-3 mm); (B e C) folículos grandes (4-5 mm); (D) folículo pré-ovulatório (> 5 mm); (E e F) corpos lúteos..... 25
- Figura 3 - Distribuição dos animais de acordo com o número de ondas foliculares observadas durante os protocolos hormonais de sincronização do estro, durante os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade..... 30
- Figura 4 - Perfil das concentrações séricas médias de progesterona (P4) de acordo com os grupos experimentais (G – 1CIDR e G – 2CIDR) e períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade) em ovelhas da raça Santa Inês..... 44
- Figura 5 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) no período entre o Dia 0 a 7 dos protocolos de acordo com o efeito principal do período estacional (anestro, transição e ciclicidade)..... 45
- Figura 6 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 0 a 7 dos protocolos de acordo com o efeito principal do grupo (G – 1CIDR e G – 2CIDR)..... 46

Figura 7 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 0 a 7 dos protocolos de acordo com o efeito principal do Dia dos protocolos.....	46
Figura 8 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 8 a 15 dos protocolos de acordo com a interação grupo e dias do protocolo.....	48
Figura 9 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 8 a 15 dos protocolos de acordo com o efeito principal do período estacional	48
Figura 10 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre os dias 15 a 30 dos protocolos de acordo com o efeito principal do período estacional (anestro, transição e ciclicidade).....	49
Figura 11 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre os dias 15 a 30 dos protocolos de acordo com o efeito principal do grupo (G – 1CIDR e G – 2CIDR).....	50
Figura 12 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 15 a 30 dos protocolos de acordo com o efeito principal do Dia dos protocolos.....	50

Capítulo III - Viabilidade da superovulação iniciada na emergência da primeira e última ondas foliculares, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro

Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação da primeira onda folicular, de acordo com os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade.....	62
Figura 2 - Esquema dos tratamentos hormonais destinados à superovulação da última onda folicular do protocolo, de acordo com os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade.	63

Figura 3 – Perfil sérico de progesterona (P4) em ovelhas da raça Santa Inês submetida a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular nos períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade; indicação esquemática dos principais eventos do protocolo.....	72
Figura 4 – Perfil sérico de progesterona (P4) em ovelhas da raça Santa Inês submetida a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular nos períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade; indicação esquemática dos principais eventos do protocolo.....	73

DINÂMICA FOLICULAR NO USO EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS SANTA INÊS

RESUMO - Foram realizados dois experimentos, no primeiro, 70 ovelhas foram submetidas a um dos dois protocolos de sincronização do estro, em três períodos estacionais (Fatorial 2x3; Anestro: G-1CIDR, n=12 e G-2CIDR, n=11; Transição: G-1CIDR, n=12 e G-2CIDR, n=12; Ciclicidade: G-1CIDR, n=11 e G-2CIDR, n=12). O estro foi sincronizado com um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; CIDR) por 14 dias. No G-2CIDR, o CIDR foi trocado por um novo no D7 (D0 = início do protocolo). No D0 e 14, 2,5 mg de um análogo da PGF2 α (dinoprost) foram administradas, i.m., em todas as ovelhas. Exames ultrassonográficos dos ovários, por via transretal, foram realizados diariamente durante os protocolos (14 dias). Os dados foram analisados por regressão logística utilizando o Proc GLIMMIX do SAS (P<0,05). As ovelhas apresentaram de duas a cinco emergências de ondas foliculares durante os tratamentos [2 ondas: 4,29% (3/70); 3 ondas: 34,29% (24/70); 4 ondas: 52,86% (37/70); e 5 ondas: 8,57% (6/70) das ovelhas]. Não houve efeito do tratamento sobre os dias de emergência das ondas (Onda 1: 2,05 \pm 0,42 vs. 2,02 \pm 0,37; Onda 2: 5,69 \pm 0,42 vs. 5,65 \pm 0,37; Onda 3: 9,77 \pm 0,42 vs. 10,09 \pm 0,37; Onda 4: 11,85 \pm 0,39 vs. 12,12 \pm 0,35 e; Onda 5: 12,5 \pm 0,40 vs. 12,16 \pm 0,78 dias para G-1CIDR e G-2CIDR respectivamente; P>0,05). Similarmente, os períodos estacionais não interferiram sobre os dias de emergência para as ondas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Anestro: 2,01 \pm 0,46, 5,11 \pm 0,47, 9,33 \pm 0,45, 12,27 \pm 0,40 e 13,50 \pm 0,40; Transição: 2,12 \pm 0,51, 5,95 \pm 0,52, 10,32 \pm 0,51, 11,16 \pm 0,78 e 11,61 \pm 0,50; e Ciclicidade: 1,99 \pm 0,42, 5,95 \pm 0,42, 10,14 \pm 0,42 e 12,08 \pm 0,43; P>0,05). Na estação de ciclicidade, nenhuma ovelha apresentou cinco ondas. No segundo experimento, foram utilizadas 60 novas fêmeas, sendo 20 para cada período (ciclicidade, transição e anestro) e 10 para cada grupo, submetidos aos protocolos iniciados próximos à emergência da primeira (G-PrimeiraOnda) ou última (G-ÚltimaOnda) ondas foliculares. O estro foi

sincronizado com um CIDR, o qual permaneceu no anestro, transição e ciclicidade, respectivamente, por 6, 6 ou 8 dias para G-PrimeiraOnda e 12, 12 ou 13 dias para G-ÚltimaOnda. O G-ÚltimaOnda realizado durante a estação de transição diferiu, ainda, pela substituição do CIDR por um novo, no D7. O tratamento com FSHp consistiu na administração de 200 mg fracionadas em 8 aplicações intervaladas de 12 h (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 e 10 mg), iniciando 2 dias antes da remoção do CIDR. Ao final do tratamento com P4 foram administradas 200 UI de eCG e 37,5 µg de um análogo da PGF2α (D-Cloprostenol), i.m., em todas as ovelhas. As avaliações realizadas foram as mesmas do primeiro experimento, além da colheita de embriões. Os dados foram analisados por regressão logística utilizando o Proc GLIMMIX do SAS (P<0,05). Apenas para o período de ciclicidade observou-se variação entre grupos para a taxa de ovulação (97,90±1,45 e 88,55±4,45 para G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda; P<0,05) e o número de ovulações (17,00±2,31 e 12,50±2,62 para G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda; P<0,05). O número de embriões viáveis não sofreu efeito do protocolo ou período estacional. Houve alta variabilidade para as repostas superovulatória e de produção de embriões.

Palavras-chave: emergência de onda folicular; ovulação; progesterona; embriões; ovinos.

FOLLICULAR DYNAMICS IN USE IN ESTRUS SYNCHRONIZATION AND SUPEROVULATION PROTOCOLS IN SANTA INES EWES

ABSTRACT – Two experiments were conducted, in the first, 70 ewes were submitted to one of two synchronization protocols in three seasons (Factorial 2x3; Non-breeding: G-1CIDR, n=12 and G-2CIDR, n=11; Transition: G-1CIDR, n=12 and G-2CIDR, n=12; Breeding: G-1CIDR, n=11 and G-2CIDR, n=12). On D0 (randomized day of estrus cycle), the estrus were synchronized with a P4 device (CIDR) for 14 days. However, in G-2CIDR, the CIDR was replaced by a new one on D7. On D0 and D14, 2.5mg of a PGF2α analogue (dinoprost), i.m., were

administered, and on D14, all ewes received 300 IU of eCG (Novormon™, Syntex-Argentina). Ultrasonographic exam was performed daily between D0 and D14 and, every 8 hours until D19. Data were analyzed by GLIMMIX using the SAS ($P < 0.05$). Ewes presented two to five follicular waves emergencies during treatments [2 waves: 4.29% (3/70); 3 waves: 34.29% (24/70); 4 waves: 52.86% (37/70) and; 5 waves: 8.57% (6/70) of ewes]. There were no effect of treatment on emergency waves days (Wave 1: 2.05 ± 0.42 vs. 2.02 ± 0.37 ; Wave 2: 5.69 ± 0.42 vs. 5.65 ± 0.37 ; Wave 3: 9.77 ± 0.42 vs. 10.09 ± 0.37 ; Wave 4: 11.85 ± 0.39 vs. 12.12 ± 0.35 and; Wave 5: 12.5 ± 0.40 vs. 12.16 ± 0.78 days for G-1CIDR and G-2CIDR respectively; $P > 0.05$). Similarly, there were no effect of seasons on these variables (Non-breeding: 2.01 ± 0.46 , 5.11 ± 0.47 , 9.33 ± 0.45 , 12.27 ± 0.40 and 13.50 ± 0.40 ; Transition: 2.12 ± 0.51 , 5.95 ± 0.52 , 10.32 ± 0.51 , 11.61 ± 0.50 and 11.16 ± 0.78 and; Breeding: 1.99 ± 0.42 , 5.95 ± 0.42 , 10.14 ± 0.42 and 12.08 ± 0.43 days for waves 1, 2, 3, 4 and 5, respectively, $P > 0.05$). In Breeding season no ewes showed five waves. In the second experiment, were used 60 new females, 20 for each season (breeding, transition and non-breeding) and 10 for each group that received one of two superovulatory protocols according to the time that FSH treatment were initiated (G-FirstWave and G-LastWave). Ewes were treated with P4 device (CIDR) for 6, 6 and 8 days for G-FirstWave and for 12, 12 and 13 days for G-LastWave in non-breeding, transition and breeding, respectively. Additionally, in G-LastWave performed during the transition season differed by CIDR replacement on D7. All ewes received two injections of 37.5 μg of a PGF 2α analogue (D-cloprostenol) on D0 and at CIDR removal. The superovulatory regimen consisted of eight i.m. injections of pFSH administrated twice daily (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 and 10 mg of pFSH). A single i.m. dose of 200 IU of eCG was given concurrently the CIDR removal. Ewes were mated by a fertile ram. Embryo collections were accomplished 7 days after CIDR withdrawal. The evaluations were the same as the first experiment, with addition of embryo assessment. Data were analyzed using Proc GLIMMIX by SAS ($P < 0.05$). In breeding season, there were difference between groups for the ovulation rate (97.90 ± 1.45 vs. 88.55 ± 4.45 for G-FirstWave

and G-LastWave, respectively; $P < 0.05$) and number of ovulation (17.00 ± 2.31 vs. 12.50 ± 2.62 for G-FirstWave and G-LastWave, respectively; $P < 0.05$). The number of viable embryo had no effect of the protocols or season. There was high variability on superovulatory response and embryo yield.

Keywords: follicular wave emergence; ovulation; progesterone; embryo; sheep.

Capítulo I

Referencial Teórico

Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e superovulação em ovelhas Santa Inês

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial, que se intensificou nas últimas décadas, sobretudo nos países em desenvolvimento, detentores dos maiores rebanhos (MORAND-FEHR & BOYAZOGLU, 1999). Acompanhando esta tendência projeta-se uma multiplicação do rebanho nacional, da ordem de cinco vezes para os próximos vinte anos, atingindo mais de 100 milhões de cabeças (FONSECA & BRUSCHI, 2005). Neste contexto, a raça Santa Inês é uma das que apresenta alta produtividade, qualidade de carne e adequada adaptação ao nosso meio, fato observado pela sua presença em todos os estados do país, além da valorização dos animais de elite, podendo ser importante item de exportação, a exemplo do que ocorre com as raças oriundas da África do Sul (i.e. Dorper) e das exploradas na Oceania (i.e. Merino, Corriedale, Dorset).

Assim, ganha destaque o desenvolvimento de projetos que visem o melhoramento genético (i.e. teste de progênie, MOTE) para identificar genótipos superiores; e nesta perspectiva há necessidade de amplo conhecimento dos fenômenos biológicos ligados à fisiologia da reprodução, de forma a permitir melhora da eficiência reprodutiva e conseqüentemente produtiva, assegurando viabilidade econômica cada vez mais atraente.

Das biotécnicas a serem utilizadas com a finalidade de viabilizar rápida progressão do número de descendentes por fêmea, a transferência de embriões é indubitavelmente a de maior relevância. Os registros da movimentação mundial na área de transferência de embriões em pequenos ruminantes (FONSECA et al., 2010), embora instável e, de certo modo, imprecisa, podem demonstrar o sucesso desta prática. No Brasil não há dados oficiais, entretanto, verifica-se expressivo interesse dos criadores e de pesquisadores na otimização deste recurso tecnológico¹. Complementarmente a esta última informação, cabe destacar que o maior problema a ser solucionado de modo a permitir que a transferência de embriões se viabilize ainda mais, faz-se basilar obtermos informações mais

¹ Interpretação pessoal durante a “5ª Feira Internacional de Caprinos e Ovinos” e “Congresso Internacional da FEINCO”.

consistentes sobre protocolos de superovulação; maior entrave para o incremento da eficiência das respostas superovulatórias e de produção de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Múltipla ovulação e transferências de embriões

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) baseia-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da monta natural ou inseminação artificial, colheita dos embriões por meio de lavagem uterina e posterior transferência (inovulação) dos embriões a fêmeas receptoras (REICHENBACH et al., 2002). Dessa forma, possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva.

O impacto da MOTE é evidente na multiplicação dos rebanhos, programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como, no resgate e conservação de germoplasmas animais, nos trâmites comerciais (nacional ou internacionalmente) e no apoio a outras biotécnicas relacionadas (OLIVEIRA, 2011a).

A seleção de fêmeas doadoras a participarem de um programa de MOTE como doadoras é um dos pontos críticos dessa biotécnica. A escolha de animais superiores garantirá a multiplicação desse potencial genético, conferindo aceleração e maior precisão no processo de seleção e melhoramento animal. Os critérios a serem utilizados podem basear-se em dados da genealogia, conformação corporal, desempenho e teste de progênie. Em geral, a melhor opção é associar os métodos de avaliação para a correta seleção de animais com características desejáveis (OLIVEIRA, 2011b).

2.1.1 Protocolos superovulatórios

O processo superovulatório constitui uma das etapas iniciais dos programas de MOTE e tem como princípio o fornecimento de preparações hormonais que estimulam o crescimento e, subsequente, ovulação de uma série de folículos.

Dentre uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais, a alta variabilidade das respostas à estimulação ovariana é, destacadamente, o maior desafio frente ao aumento da eficiência dos programas de MOTE em ovinos. O mesmo comportamento é registrado em outras espécies, a exemplo dos bovinos. Acredita-se que esta heterogeneidade nos resultados estimulatórios, em ovinos, decorra do uso de protocolos que consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral, e não o fenômeno biológico da dinâmica folicular (OLIVEIRA, 2011a). Alguns pontos críticos têm sido apontados como potenciais responsáveis pelos efeitos negativos, destacando-se: (1) o perfil de progesterona induzido pelos dispositivos utilizados no tratamento (BERLINGUER et al., 2007); (2) a condição folicular presente ao início do protocolo superestimulatório (RUBIANES et al., 1995; 1997; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002); e (3) a deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH após tratamento com gonadotrofinas (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003). As respostas são acompanhadas pela ampla variação nas taxas de ovulação e fecundação dos oócitos, bem como, no número e qualidade dos embriões recuperados.

2.1.1.1 *Superestimulação gonadotrófica*

Durante o intervalo interovulatório (i.e. ciclo estral) nas ovelhas, há tipicamente três ou quatro ondas de crescimento folicular. A emergência de cada onda é primariamente controlada pelo incremento das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH). Com o desenvolvimento dessa população de folículos, as concentrações do FSH diminuem pelo estabelecimento da dominância (BARTLEWSKI et al., 2011). Em outras palavras, um a quatro folículos podem alcançar o diâmetro ovulatório em um ciclo normal (EVANS, 2003), dentre outros

aspectos, privando os demais folículos (i.e. subordinados) do FSH (GINTHER et al., 1996). Com base neste princípio, o tratamento superovulatório é realizado mediante aporte de altas doses de gonadotrofinas exógenas, como FSH, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina menopausal humana (hMG). Em resposta a este procedimento há incremento da taxa ovulatória e, conseqüentemente, do número de embriões obtidos por fêmea tratada.

Diversas preparações hormonais estão disponíveis comercialmente. O número e a frequência de administrações, bem como, a dose empregada pode variar de acordo com o protocolo estabelecido. Como relato histórico, os tratamentos estimulatórios iniciaram-se com o uso da eCG em dose única, normalmente, de 1000-1500 UI administrada 48 horas antes da retirada do progestágeno (RANIO, 1991). Atualmente, a eCG não é utilizada isoladamente em protocolos de superovulação por promover alta taxa de folículos anovulatórios, que se luteinizam; efeito dependente da dose, momento de aplicação e vida média do preparado comercial (LÓPEZ-SEBASTIÁN et al., 2006). A produção de anticorpo anti-eCG, observada em fêmeas que receberam o tratamento repetidas vezes, tem ação biológica de inibir a atividade estimulatória da gonadotrofina administrada, levando a um atraso ou ausência da ovulação, podendo afetar a fertilidade dos animais (ROY et al., 1999).

Grande melhoria na eficiência dos programas de superovulação para produção *in vivo* de embriões tem sido observada nas últimas três décadas pela substituição da eCG por preparados de FSH de origem suína, ovina ou caprina (OLIVEIRA, 2011a). Com este hormônio se obtêm taxas de ovulações superiores e menor incidência de folículos anovulatórios, além de resposta individual mais uniforme quando comparado aos tratamentos com eCG (ARMSTRONG & EVANS, 1983). No entanto, para estimular adequadamente os folículos é necessário administrá-lo a intervalo de 12 horas, devido suas concentrações na circulação periférica decrescerem a concentrações basais em 10 horas (DEMOUSTIER et al.,

1988). Tal fato gera a necessidade de repetir as administrações em um curto intervalo de tempo, o que intensifica o manejo, tornando-o menos prático.

Usualmente o tratamento superestimulatório é iniciado 48 horas antes da retirada do progestágeno, administrado em doses decrescentes, durante 2 - 4 dias (COGNIÉ, 1999). Recomenda-se o emprego de FSH em 6 a 8 aplicações. Em geral, o FSH exógeno começa a atuar sobre a população de folículos presente nos ovários das ovelhas entre 12 e 24 horas após o início do tratamento. Decorridas 48 horas, se observa crescimento de folículos de 2 a 5 mm. Os folículos em crescimento alcançam o tamanho pré-ovulatório entre 36 e 60 horas, concentrando-se entre 48 e 60 horas o processo ovulatório (GONZÁLEZ-BULNES et al., 1997). A dose total utilizada é relativamente elevada (FONSECA et al., 2007). No Brasil emprega-se, comumente, protocolos superestimulatórios com doses totais de 256 mg (Folltropin®, GUSMÃO, 2006; OLIVEIRA, 2008) ou 200 UI (Pluset®, CORDEIRO et al., 2003) por ovelha. Mais recentemente, há registro de desempenho similar com dose inferior (175 mg de FSHp, BARTLEWSKI et al., 2009).

Muitas vezes, uma pequena dose da eCG (200 – 400 UI) é associada ao tratamento, sendo administrada no momento da retirada do dispositivo de progesterona ou progestágeno (MENCHACA et al., 2010). Esta prática baseia-se na hipótese de que a suplementação com LH é importante para a maturação final dos folículos, entretanto, sua eficácia é discutível (MENCHACA et al., 2009). Devido a longa meia-vida da eCG, há produção de estradiol após a ovulação (BARRETT et al., 2004). Consequentemente, têm sido reportados efeitos deletérios no oviduto (resultando em falhas de fecundação dos oócitos) e, sobre a frequência de regressão luteal prematura. Vale ressaltar que o momento da inseminação artificial deve ser antecipado quando se fizer uso desta associação. Recentemente, um outro protocolo de administração desta associação hormonal (FSH e eCG) indica grande contribuição para a manutenção de altas concentrações de FSH endógeno durante tratamento gonadotrófico. A associação

da eCG é realizada ao início do tratamento superestimulatório com FSH. Até o momento, não há registros de efeitos adversos quando do seu emprego (BARTLEWSKI et al., 2009).

2.1.1.2 *Protocolos-base para superovulação*

O procedimento superestimulatório pode ser realizado com base na observação de estro natural ou sincronização de estro. Tradicionalmente, utilizam-se progesterona ou progestágenos impregnados em dispositivos/pessários vaginais ou implantes auriculares, os quais permanecem por um tempo de exposição superior a 10 dias para a indução e sincronização do estro (FONSECA et al., 2007). O mais comum é que em ovelhas o progestágeno permaneça por 14 dias (i. e. período de duração da fase lútea). Nesses protocolos as administrações de gonadotrofinas exógenas iniciam-se dois dias antes do término do período progesterônico. Entretanto, estes tratamentos tradicionais foram definidos há vários anos e não consideravam os conhecimentos atuais do desenvolvimento folicular (MENCHACA et al., 2010), sendo atualmente relacionados inúmeros efeitos adversos.

Assim, a grande problemática que tem intensificado as pesquisas relacionada a MOTE é referente à ampla variabilidade das respostas superovulatórias aos tratamentos gonadotróficos. Essa é, sem dúvida, o principal fator limitante da transferência de embriões em ovinos e caprinos (COGNIÉ, 1999; DRIANCOURT, 2001; COGNIÉ et al. 2003; GONZÁLEZ-BULNES et al. 2004). Na produção *in vivo* de embriões, independentemente dos hormônios utilizados no tratamento superovulatório, protocolo de administração e método de sincronização das ovulações, as maiores limitações responsáveis pela variabilidade das respostas estão, possivelmente, relacionadas à dinâmica folicular, equilíbrio estímulo-inibição que determinam a taxa de ovulação em cada espécie, e aos mecanismos intra-ovarianos que controlam o crescimento folicular (LÓPEZ-SEBASTIÁN et al., 2006).

Apesar dos benefícios da sincronização, atribuí-se aos progestágenos efeito negativo ao número de ovulações e embriões transferíveis (BERLINGUER et al., 2007). O perfil de progesterona induzido pelo tratamento não é constante, havendo diminuição a concentrações abaixo do fisiológico, particularmente, ao final dos protocolos longos (10 a 14 dias). Esse evento é associado à alteração do padrão de crescimento folicular e persistência folicular (LETELIER et al., 2009), bem como, a interferência no processo de fecundação e desenvolvimento de embriões de boa qualidade (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2005). Estratégias usadas, até o momento, para superar o efeito negativo dos tratamentos com progestágenos incluem: (1) inserção de um segundo dispositivo de progesterona (do Dia 7 ao Dia 14) para evitar concentrações subluteais do hormônio durante o tratamento (GUSMÃO, 2006; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002); (2) suplementação de gonadotrofinas logo após a remoção do dispositivo até a ovulação para evitar efeito nocivo do folículo dominante (MENCHACA & RUBIANES, 2002; MENCHACA et al., 2007); (3) administrar tratamento superovulatório baseando-se na detecção do estro natural (início das administrações de gonadotrofinas quatro dias após o estro), assim, faz-se uso de níveis fisiológicos de progesterona produzidos pelo corpo lúteo cíclico (MAYORGA et al., 2011) ou; (4) encurtar o período do tratamento com progestágenos para 5 – 7 dias (MENCHACA et al., 2009).

Paralelamente, diversos estudos apontam que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório interfere na resposta ao tratamento. Acredita-se que há um efeito prejudicial da dominância folicular na resposta superovulatória em pequenos ruminantes. Em outras palavras, tratamentos superovulatórios iniciados na ausência de um folículo dominante têm resultado em melhores taxas de recrutamento folicular, ovulação e produção de embriões (RUBIANES et al., 1995; 1997; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002). A presença de folículos dominantes (maiores que 5-6 mm) no início do tratamento com FSH parece afetar a maturação e a ovulação (RUBIANES et al., 1995; 1997) dos folículos menores. Esta seria uma das possíveis justificativas para a alta

frequência de folículos anovulatórios em tratamentos superovulatórios destes animais. A evidência de que o folículo dominante possa exercer domínio, não só por vias sistêmicas, mas também por fatores locais, reforça a necessidade de garantir a ausência de folículos grandes no início da superestimulação (MENCHACA et al., 2010). Nos tratamentos tradicionais, 70-85% das doadoras apresentam grandes folículos dominantes ao início dos tratamentos com FSH (MENCHACA et al., 2007). Considerando a imprevisibilidade do dia da emergência de cada onda folicular em ovinos, a verdadeira questão é como sincronizá-la (MENCHACA et al., 2010).

Já existem algumas estratégias focadas em começar o tratamento superovulatório na ausência de um folículo dominante (i. e. próximo a emergência da onda folicular) em pequenos ruminantes, destacando-se o: (1) protocolo “Dia 0”, no qual se emprega a pré-sincronização do estro e superestimulação da primeira onda emergente (RUBIANES & MENCHACA, 2006; MENCHACA et al., 2007) e; (2) tratamentos com antagonistas do GnRH antes da superestimulação gonadotrófica, o qual pode ser uma alternativa para eliminar o folículo dominante (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004). Outra estratégia, comumente empregada em bovinos, é a indução de uma nova onda folicular pelo emprego de estrógenos associado ao progestágeno (BÓ et al., 1995). Entretanto, poucos estudos têm avaliado este tratamento em ovinos e caprinos (MENCHACA et al., 2010). Os dois fármacos conjuntamente promovem supressão das concentrações de FSH e regressão dos folículos dominantes em ovelhas durante anestro (BARRETT et al., 2008). Uma nova onda de FSH e emergência da onda folicular ocorreu, aproximadamente, três a cinco dias após o tratamento com o estrógeno (BARRETT et al., 2008; BARTLEWSKI et al., 2008). Nestes estudos, o 17 β -estradiol foi administrado por volta da metade do tratamento (14 dias) com progestágeno, resultando em uma redução da variabilidade da resposta ovariana, sem, no entanto, afetar a produção embrionária.

Embora alguns avanços estejam sendo conquistados, roga-se por mais estudos na busca por tratamentos que efetivamente sincronizem uma nova onda folicular em ovinos. A ampliação de conhecimentos nesta perspectiva terá grande importância e relevância quando associados à superovulação. Acredita-se que haverá melhora na resposta superovulatória e produção de embriões viáveis em ovinos (OLIVEIRA, 2011a).

2.1.1.3 *Indução da ovulação*

Outra possível causa relacionada à alta variabilidade da resposta superovulatória e produção de embriões em pequenos ruminantes está associada à deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH após tratamento com gonadotrofina exógena (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003) ou devido à presença de folículos não responsivos, o que é relacionado a uma baixa regulação dos receptores de LH na granulosa e teca (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992). Paralelamente, há registro de falhas de fecundação em ovelhas superestimuladas, o que poderia ser reduzido melhorando a sincronia entre as ovulações e os procedimentos de inseminação artificial (MENCHACA et al., 2010).

Neste contexto, alguns estudos em MOTE (PICAZO et al., 1996; OLIVEIRA, 2008; MENCHACA et al., 2009) têm focado no incremento da taxa ovulatória e número de embriões viáveis por modificar a proporção de FSH:LH no final do tratamento superestimulatório, administrando-se LH ou GnRH exógeno. É importante ressaltar ainda que nesses protocolos há modificação no momento ovulatório, informação que deve ser considerada quando for utilizar a inseminação artificial em tempo fixo (OLIVEIRA et al., 2008a; 2008b).

2.1.1.4 *Controle da regressão luteal precoce*

A regressão luteal precoce é outra entrave que tem afetado os resultados dos programas de MOTE em pequenos ruminantes. Este fenômeno é exacerbado

em ovelhas superovuladas e parece estar associado a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase luteal inicial, notando-se como consequência, um decréscimo na resposta superovulatória e diminuição do número e qualidade dos embriões (FONSECA et al., 2007). 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 em cabras acometidas (SAHARREA et al., 1998). Em ovelhas superovuladas, a frequência de regressão luteal precoce pode variar de 6 a 75 % (FUKUI et al., 1998), e acometer a formação de todos ou parte dos corpos lúteos de um mesmo animal (OLIVEIRA, 2008). A administração de progesterona exógena, agentes anti-luteolíticos (antiinflamatório; i. e. inibidores da prostaglandina) ou luteotróficos (hCG, GnRH, LH) pode prevenir ou reduzir os efeitos deletérios da regressão luteal precoce (FONSECA et al., 2005). Inibidores da prostaglandina-sintetase como a Flunixin meglumine administrado de uma a duas vezes ao dia, entre o 2º e 4º dia após a detecção do estro (período crítico), auxiliam no bloqueio do processo de regressão prematura dos corpos lúteos. Neste sentido, tem-se observado incremento na recuperação de embriões viáveis (TRALDI, 2002).

2.1.2 Métodos de acasalamento

O acasalamento das fêmeas doadoras de embriões pode ser feito por monta natural, livre ou controlada; inseminação artificial (IA) seguida da detecção de estro; ou ainda inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A variabilidade no momento das ovulações é um fator limitante para se obter uma elevada taxa de fecundação e torna-se particularmente crítico quando do uso de inseminação artificial com sêmen congelado (FREITAS & SIMPLÍCIO, 2002). Desta forma, o método que apresenta melhor eficiência é a monta natural.

Quando da utilização da inseminação artificial, recomenda-se realizar de duas a três repetições intervaladas de 12 horas (FONSECA, 2005). O mesmo

deve ser empregado quando do uso de monta natural controlada. A necessidade de repetições desses procedimentos faz-se necessário devido à assincronia entre as ovulações de folículos de um mesmo animal e entre fêmeas. Se a manifestação do estro for detectada, a fêmea deve ser inseminada ou coberta de 12 a 24 horas após o início deste. A IA realizada em função do início do estro apresenta maior taxa de fecundação comparada a IATF (VALLET & BARIL, 1990). O momento recomendado para realizar a IATF é discutível, visto o desconhecimento do momento preciso em que ocorrem as ovulações de doadoras sincronizadas pelos diferentes protocolos hormonais disponíveis. Segundo GUSMÃO (2006) a primeira IATF deve ser realizada 36 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Variação nesse momento é observada de acordo com o protocolo utilizado e principalmente quando se adiciona ao tratamento indutores de ovulação (ex. GnRH, LH e hCG).

2.1.3 Colheita e avaliação de embriões

A colheita dos embriões é feita por meio de lavagem dos cornos uterinos entre o 6° e o 8° dia após o início do estro. Esse período é estabelecido baseando-se principalmente: (1) no tempo em que o embrião leva para percorrer a tuba uterina e atingir o ápice do corno uterino; e (2) na recuperação de embriões em estágio de desenvolvimento em que apresenta a zona pelúcida íntegra, viabilizando a garantia sanitária (FREITAS & SIMPLÍCIO, 2002).

A lavagem uterina pode ser realizada basicamente por três métodos: laparotomia, laparoscopia e pela via transcervical (ISHWAR & MEMON, 1996; LIMA et al., 1996). Destes, o procedimento cirúrgico (laparotomia) é o mais invasivo, limitando a possibilidade de repetição sequencial da técnica devido à ocorrência de aderências entre o sistema reprodutor e tecidos circunvizinhos. Embora seja uma técnica segura, precisa e muito empregada submete a fêmea a

todos os riscos e sequelas inerentes ao processo cirúrgico (ANDRIOLI et al., 1999).

Em virtude da anatomia da cérvix, especialmente em ovelhas, e dimensões do aparelho reprodutor nos pequenos ruminantes, por muito tempo o método cirúrgico e o laparoscópico tornaram-se as únicas opções para esta etapa. Com o desenvolvimento da técnica não cirúrgica de colheita de embriões para os pequenos ruminantes ampliou-se as possibilidades de emprego dos programas de MOTE, visto que reduziu a ocorrência de complicações futuras para as fêmeas (FONSECA et al., 2011).

O meio de lavagem utilizado é a solução tampão-fosfato (PBS) na quantidade de 40 a 60 mL por corno uterino, fracionado em duas lavagens sucessivas. A taxa de recuperação de estruturas é variável de acordo com o método de colheita (SCUDAMORE et al., 1991), qualidade do procedimento e prática do técnico. Em geral, recupera-se mais de 50-60% das estruturas. Essa taxa é calculada sobre a resposta ovulatória, indicando-se sua avaliação por ultrassonografia ou por via laparoscópica no dia da colheita dos embriões. Embora a via transcervical apresente vantagens expressivas frente às demais técnicas, sua eficiência (taxa de recuperação de estruturas) é ainda inferior (FONSECA et al., 2011).

O meio de colheita recuperado após lavagem dos cornos uterinos é avaliado, sob estereomicroscópio (aumento de 40-80x), quanto à morfologia das estruturas encontradas. Os embriões encontrados são classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade. Espera-se que embriões colhidos entre o 6º e 8º dia após o início do estro estejam entre os estádios de mórula compacta e blastocisto expandido. Embriões viáveis são classificados de graus I a III (IETS, 1998, entretanto, essa avaliação não é garantia de viabilidade da prenhez e nascimento a termo. Recomenda-se a inovação somente dos embriões classificados de I a III. Os embriões de graus I e II apresentam maior capacidade de desenvolvimento (LÓPEZ-SEBASTIÁN, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

A eficiência das técnicas de múltipla ovulação e transferência de embriões em ovelhas ainda é um desafio, particularmente devido à alta variabilidade na resposta à estimulação ovariana com hormônio folículo estimulante (FSH) exógeno (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004). Acredita-se que esta heterogeneidade nos resultados estimulatórios decorra do uso de protocolos que consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral (COGNIÉ, 1999), e não o fenômeno biológico da dinâmica folicular (EVANS et al., 2000).

Assim, infere-se que um melhor conhecimento da atividade ovariana permitirá, de modo consistente, uma melhora significativa dos resultados obtidos pelas biotécnicas de superovulação e transferência de embriões, como relatado para outras raças de ovinos e caprinos por GONZÁLEZ-BULNES et al. (2002) em ovelhas Manchega, RUBIANES et al. (1997) em Merino e FONSECA et al. (2006) em cabras . Contudo, das informações cotejadas na literatura consultada poucos são os relatos de superovulação em animais da raça Santa Inês, e ainda assim nenhum deles contemplou a investigação sobre o fenômeno da dinâmica folicular (CORDEIRO et al., 2003; SILVA et al., 2004; OLIVEIRA, 2008).

Ademais, faz-se prudente destacar que o conhecimento a ser obtido sobre a atividade ovariana terá maior importância e relevância para a aplicação dos procedimentos superestimulatórios, avaliando-se este fenômeno biológico nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro.

Capítulo II

Dinâmica folicular e perfil hormonal em protocolos base para superovulação, com ou sem a troca do dispositivo de progesterona, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro

**DINÂMICA FOLICULAR E PERFIL HORMONAL EM PROTOCOLOS BASE
PARA SUPEROVULAÇÃO, COM OU SEM A TROCA DO DISPOSITIVO DE
PROGESTERONA, EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS, NOS PERÍODOS
ESTACIONAIS DE CICLICIDADE, TRANSIÇÃO E ANESTRO**

RESUMO - Utilizou-se nesse estudo um total de 70 ovelhas da raça Santa Inês, as quais foram submetidas concomitantemente a um dos dois protocolos de sincronização do estro, em três períodos estacionais (Fatorial 2x3; Anestro: G-1CIDR, n=12 e G-2CIDR, n=11; Transição: G-1CIDR, n=12 e G-2CIDR, n=12; Ciclicidade: G-1CIDR, n=11 e G-2CIDR, n=12). O estro foi sincronizado com um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; CIDR) por 14 dias. No G-2CIDR, o CIDR foi trocado por um novo no D7 (D0 = início do protocolo). No D0 e 14, 2,5 mg de um análogo da PGF2 α (dinoprost) foram administradas, i.m., em todas as ovelhas. Exames ultrassonográficos dos ovários foram realizados diariamente, por via transretal, durante os períodos próprios de observação (da aplicação à remoção do dispositivo CIDR) quanto à dinâmica folicular protocolos. Ao final dos protocolos hormonais o intervalo entre as avaliações foi encurtado para 8 h até a detecção das ovulações. Onda folicular foi identificada como um grupo de folículos (2-3 mm) que cresceram, sendo que um ou mais atingiram o diâmetro mínimo de 4,5 mm. O dia da emergência foi considerado quando o maior folículo, ainda com 2-3 mm, foi identificado pela primeira vez. Os dados foram analisados por regressão logística utilizando o Proc GLIMMIX do SAS ($P < 0,05$). Não houve interação entre grupo e período estacional, sendo apresentados os efeitos principais para as variáveis. Um total de 31,43% das ovelhas apresentava corpo lúteo ao início dos protocolos. As ovelhas apresentaram de duas a cinco emergências de ondas foliculares durante os tratamentos [2 ondas: 4,29% (3/70); 3 ondas: 34,29% (24/70); 4 ondas: 52,86% (37/70); e 5 ondas: 8,57% (6/70) das ovelhas]. Não houve efeito do tratamento sobre os dias de emergência das ondas (Onda 1: $2,05 \pm 0,42$ vs. $2,02 \pm 0,37$; Onda 2: $5,69 \pm 0,42$ vs. $5,65 \pm 0,37$; Onda 3: $9,77 \pm 0,42$ vs. $10,09 \pm 0,37$; Onda 4: $11,85 \pm 0,39$ vs. $12,12 \pm 0,35$; e Onda 5:

12,5±0,40 vs. 12,16±0,78 dias para G-1CIDR e G-2CIDR respectivamente; P>0,05). Similarmente, os períodos estacionais não tiveram efeito sobre as variáveis (Anestro: 2,01±0,46, 5,11±0,47, 9,33±0,45, 12,27±0,40 e 13,50±0,40; Transição: 2,12±0,51, 5,95±0,52, 10,32±0,51, 11,16±0,78 e 11,61±0,50; Ciclicidade: 1,99±0,42, 5,95±0,42, 10,14±0,42 e 12,08±0,43 dias para as ondas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente; P>0,05). Na ciclicidade, nenhuma ovelha apresentou cinco ondas. Utilizou-se as ondas 2 e 4 dos protocolos hormonais de sincronização do estro para determinação dos momentos iniciais da superestimulação gonadotrófica. Os protocolos hormonais não induziram diretamente emergências de ondas, entretanto, houve um padrão de suas ocorrências, independentemente dos tratamentos e período estacional. Permitiu-se, então, a definição de novos protocolos hormonais de superovulação de acordo com as peculiaridade estacionais.

Palavras-Chave: dinâmica folicular, progesterona, sincronização do estro, ovinos

**FOLLICULAR DYNAMICS, HORMONE PROFILE IN SYNCHRONIZATION
PROTOCOL USED IN SUPEROVULATION, WITH OR WITHOUT CIDR
REPLACEMENT, IN SANTA INES EWES, ON BREEDING, TRANSITION AND
NON-BREEDING SEASON**

ABSTRACT – Seventy adult ewes were submitted to one of two estrus synchronization protocols in three seasons (Factorial 2x3; Non-breeding: G-1CIDR, n=12 and G-2CIDR, n=11; Transition: G-1CIDR, n=12 and G-2CIDR, n=12; Breeding: G-1CIDR, n=11 and G-2CIDR, n=12). On D0 (randomized day of estrus cycle), the estrus were synchronized with a P4 device (CIDR) for 14 days. However, in G-2CIDR, the CIDR was replaced by a new one on D7. On D0 and D14, 2.5mg of a PGF2 α analogue (dinoprost), i.m., were administered, and on

D14, all ewes received 300 IU of eCG (Novormon™, Syntex-Argentina). Ultrasonographic exam was performed daily between D0 and D14 and, every 8 hours until D19. Data were analyzed by GLIMMIX using the SAS ($P < 0.05$). There was no interaction between groups and seasons, being presented the main effects for the variables. Ewes presented from two to five follicular waves emergencies during treatments [2 waves: 4.29% (3/70); 3 waves: 34.29% (24/70); 4 waves: 52.86% (37/70) and; 5 waves: 8.57% (6/70) of ewes]. There were no effect of treatment on emergency waves days (Wave 1: 2.05 ± 0.42 vs. 2.02 ± 0.37 ; Wave 2: 5.69 ± 0.42 vs. 5.65 ± 0.37 ; Wave 3: 9.77 ± 0.42 vs. 10.09 ± 0.37 ; Wave 4: 11.85 ± 0.39 vs. 12.12 ± 0.35 and; Wave 5: 12.5 ± 0.40 vs. 12.16 ± 0.78 days for G-1CIDR and G-2CIDR respectively; $P > 0.05$). Similarly, there were no effect of seasons on these variables (Non-breeding: 2.01 ± 0.46 , 5.11 ± 0.47 , 9.33 ± 0.45 , 12.27 ± 0.40 and 13.50 ± 0.40 ; Transition: 2.12 ± 0.51 , 5.95 ± 0.52 , 10.32 ± 0.51 , 11.61 ± 0.50 and 11.16 ± 0.78 and; Breeding: 1.99 ± 0.42 , 5.95 ± 0.42 , 10.14 ± 0.42 and 12.08 ± 0.43 days for waves 1, 2, 3, 4 and 5, respectively, $P > 0.05$). In Breeding season no ewes showed five waves. We used waves 2 and 4 of synchronization protocols to determine the moment of gonadotrophic treatments start in superovulatory protocols. Although these protocols are not developed to directly induce the follicular wave emergency, there was a pattern of emergency during both treatments, regardless of season. Furthermore, these informations will be important for the new protocols definition (i.e. superovulation or synchronization treatments); which effectively based on ovarian activity and avoid deleterious effects. This fact allowed to define news superovulation protocols according to seasonal peculiarities.

Keywords: follicular dynamics; progesterone; estrus; synchronization; embryo; sheep.

1. INTRODUÇÃO

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) em ovinos têm sido implantados com sucesso em todo mundo (MENCHACA et al., 2010). Acredita-se que a simplificação da técnica e o incremento da eficiência dos resultados possa acelerar ainda mais este desenvolvimento. De suas etapas, os protocolos superovulatórios são os responsáveis por induzir ampla variabilidade das respostas ovulatórias e produção de embriões. Tal efeito é, indubitavelmente, o principal fator limitante da MOTE nesta espécie (OLIVEIRA, 2011a).

Classicamente o tratamento superestimulatório é realizado com base na sincronização do estro por protocolos que utilizam progestágenos por longo período (BALDASSARRE, 2008). Apesar dos benefícios da sincronização, atribuí-se aos progestágenos, efeitos negativos relacionados ao perfil de progesterona induzido pelo tratamento; o qual não é constante, havendo diminuição a concentrações abaixo do fisiológico, particularmente, ao final dos protocolos longos (10 a 14 dias). Esse evento é associado à alteração do padrão de crescimento folicular e persistência folicular (LETÉLIER et al., 2009), bem como, a interferência no processo de fecundação e no desenvolvimento de embriões de boa qualidade (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2005). Paralelamente, a população folicular ao início do protocolo superestimulatório (dominância folicular) é apontada também como um dos fortes desencadeadores dos efeitos adversos. Nos tratamentos tradicionais, 70-85% das doadoras apresentam grandes folículos dominantes ao início dos tratamentos com FSH. O efeito está associado a um antecipado pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (VEIGA-LOPEZ et al., 2006), afetando negativamente a resposta ovulatória dos animais e a qualidade dos embriões (LOPEZ-ALONSO et al., 2005).

Acredita-se que esta heterogeneidade nos resultados superestimulatórios decorra do uso de protocolos que consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral (COGNIÉ, 1999). Faz-se, então, indispensável a obtenção de sólidos conhecimentos sobre o fenômeno biológico da dinâmica folicular (EVANS, 2000), destacando-se os momentos das emergências das ondas foliculares.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Obter informações sobre a dinâmica folicular em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolos hormonais de sincronização do estro (tratamentos base para a superovulação), nos períodos de ciclicidade, transição e anestro.

2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar o perfil sérico da progesterona durante os protocolos hormonais de sincronização do estro e correlacioná-los com a dinâmica folicular, nos diferentes períodos estacionais;

- Identificar o protocolo hormonal de indução do estro que promoveu maior sincronia entre os animais de cada grupo, na emergência das ondas foliculares, nos três períodos estacionais;

- Com base nas emergências das ondas foliculares, obtidas pelos métodos de sincronização do estro, definir os protocolos hormonais de superovulação com tratamentos gonadotróficos iniciados próximos às emergências da primeira e última ondas foliculares;

- Verificar as respostas de estro e ovulatória promovida pelos protocolos hormonais de sincronização, nos três períodos estacionais;

3. HIPÓTESE INICIAL

- A troca do dispositivo durante o protocolo hormonal de sincronização do estro não promoverá modificações na sincronia entre animais quanto à emergência da última onda folicular. Tal fato propiciará o desenvolvimento de protocolos superovulatórios de menor custo e maior facilidade de manejo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

Os animais foram mantidos em piquete anexo ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (DMVPRA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) - Campus de Jaboticabal (21° 15' 18" Sul e 48° 19' 19" Oeste), em sistema intensivo de criação, onde tiveram acesso a água, sal mineral e silagem de milho *ad libitum*. Ração balanceada foi fornecida na quantidade de 200g/animal/dia. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas em sala anexa ao DRA. O sangue colhido foi processado e armazenado no DMVPRA para posterior dosagens da progesterona, realizadas no Laboratório de Radioimunoensaio, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp - Botucatu; CNEN matrícula 14.998).

4.2 Animais

Foram selecionadas fêmeas sexualmente adultas (2 a 3 anos), pluríparas, não prenhes, não lactantes e consideradas híginas após realização de exame clínico geral e ultrassonográfico do aparelho reprodutor.

Utilizou-se, nesse experimento, 70 ovelhas da raça Santa Inês (Anestro, n=23; Transição, n=24; e Ciclicidade, n=23). Os animais apresentavam, ao início do experimento, peso médio de 44,84±6,61, 38,07±4,60 e 41,55±5,04 Kg para os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente.

4.3 Grupos e Tratamentos

O experimento destinou-se às avaliações de dois protocolos de sincronização do estro (G – 1CIDR e G – 2CIDR) utilizados como base para os programas de superovulação e colheita de embriões em ovelhas da raça Santa Inês (OLIVEIRA, 2008; GUSMÃO, 2006 e CORDEIRO *et al.*, 2003). Assim, os

animais foram subdivididos aleatoriamente em dois lotes uniformes e submetidos concomitantemente aos dois tratamentos. O mesmo procedimento foi repetido nos períodos estacionais de transição (verão – entre os meses de dezembro de 2008 a fevereiro de 2009), ciclicidade (final do verão ao início do inverno – entre os meses de março a junho de 2009) e anestro (inverno – entre os meses de julho e novembro de 2009; Tabela 1).

O dia inicial dos tratamentos (D0) foi escolhido indiferentemente ao dia do ciclo estral das fêmeas. As que participaram do grupo – 1 CIDR (G – 1CIDR) tiveram o estro sincronizado com a inserção de um dispositivo intravaginal contendo 0,3 g de progesterona² no Dia 0, permanecendo até o Dia 14. No momento da inserção do dispositivo (D0) foi administrado 2,5 mg de um análogo da PGF2 α (dinoprost³), por via intramuscular. Ao final do tratamento com progesterona (D14), as fêmeas receberam 300 UI de eCG⁴ e 2,5 mg de dinoprost, intramuscularmente. No Grupo – 2 CIDR (G – 2CIDR), o protocolo se alterou apenas pela substituição do dispositivo intravaginal de progesterona por um novo, no Dia 7. Os esquemas dos protocolos hormonais empregados estão demonstrados na Figura 1.

4.4 Avaliação ultrassonográfica

Observações ultrassonográficas foram realizadas, diariamente, pela manhã, durante os protocolos hormonais de sincronização do estro, a fim de pesquisar a dinâmica folicular. Ao final do protocolo, o intervalo das observações foi encurtado para 8 horas sendo mantido até 72 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, permitindo a avaliação dos momentos ovulatórios. A ovulação foi definida pela ausência do folículo dominante que foi detectado nos exames ultrassonográficos anteriores, e confirmada posteriormente pela detecção

² Eazi- Breed CIDR™ - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia

³ Lutalyse™, Pfizer, Nova Zelândia

⁴ Novormon 5000™, Shering-Plough S. A., Syntex S.A., Argentina

de corpo lúteo, no quinto dia após as ovulações. A morfologia dos corpos lúteos foi avaliada mensurando-os nos dias 5, 10 e 15 após as ovulações.

Tabela 1 - Grupos experimentais preconizados para ovelhas da raça Santa Inês submetidas a tratamento de sincronização do estro.

GRUPOS	TRATAMENTOS	PERÍODO ESTACIONAL
G – 1 CIDR	Protocolo 1 CIDR	Anestro (n=12)
		Transição (n=12)
		Ciclicidade (n=11)
G – 2 CIDR	Protocolo 2 CIDR	Anestro (n=11)
		Transição (n=12)
		Ciclicidade (n=12)

n: número de animais por grupo.

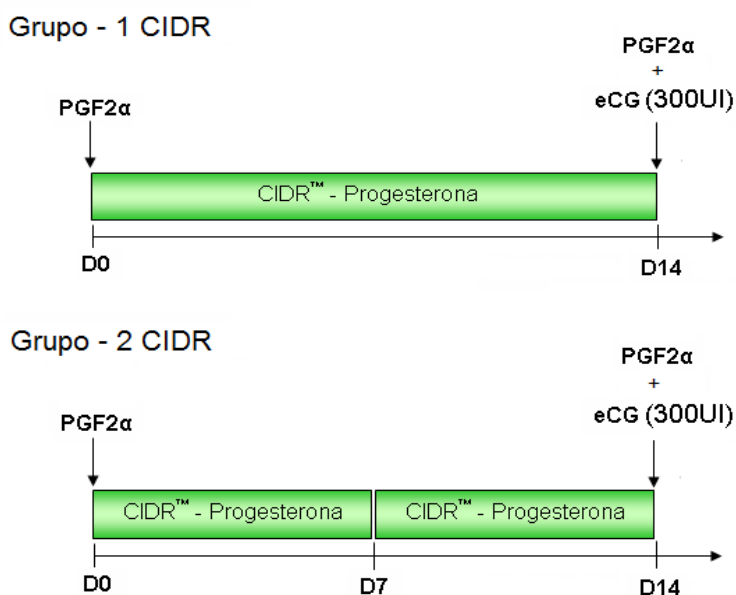


Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à sincronização do estro em ovelhas da raça Santa Inês, repetidos nos períodos estacionais de anestro, transição, e ciclicidade.

Em síntese, as observações foram conduzidas com a fêmea em posição quadrupedal, tendo a parede abdominal comprimida, para facilitar a visualização do útero e ovários. Utilizou-se equipamento de ultrassom⁵, em modo-B tempo real, contendo transdutor linear multifrequencial (6 e 8 MHz). Um tubo de plástico ligeiramente curvado (comprimento 30 cm) foi fixado ao cabo do transdutor para permitir sua manipulação externamente. Após remoção das fezes do reto e deposição do gel⁶ sobre o transdutor, este foi introduzido no reto com a superfície de contato posicionada perpendicularmente à parede abdominal. Quando a bexiga urinária foi ultrapassada e os cornos uterinos localizados, o transdutor foi lentamente rotacionado para esquerda e direita com finalidade de observar os ovários e suas estruturas. Todos os folículos de diâmetro maior ou igual 1,5 mm e corpos lúteos detectados pela ultrassonografia (Figura) foram quantificados e seus diâmetros mensurados, sendo então identificados de acordo com seu posicionamento, de modo a permitir o acompanhamento de suas transformações diárias. O diâmetro de cada estrutura foi calculado pela equação $D=(A+B)/2$; A - representa a máxima altura e B – o diâmetro transversal máximo.

4.4.1 Dinâmica Folicular

Os dados da dinâmica folicular foram tabulados e analisados seguindo a cronologia das observações. Os folículos visualizados na primeira avaliação ultrassonográfica (Dia 0, do protocolo) foram identificados por números sequenciais. Nos dias subsequentes, as imagens esquemáticas dos ovários foram reposicionadas, quando necessário, a fim de permitir a re-identificação do observado. Estruturas ovarianas como folículos grandes ou pré-ovulatórios e corpos lúteos, bem como seus posicionamentos, foram utilizados como referência para a nova identificação. Novos folículos visualizados foram, também, numerados em sequência. Assim, foi possível o acompanhamento das transformações diárias dos folículos individualizados.

⁵ Ultra-som, Aquila, Pie Medical, Holanda

⁶ Gel à base de carboxi-metil-celulose, Gerbras, Latino Química Antex, Argentina

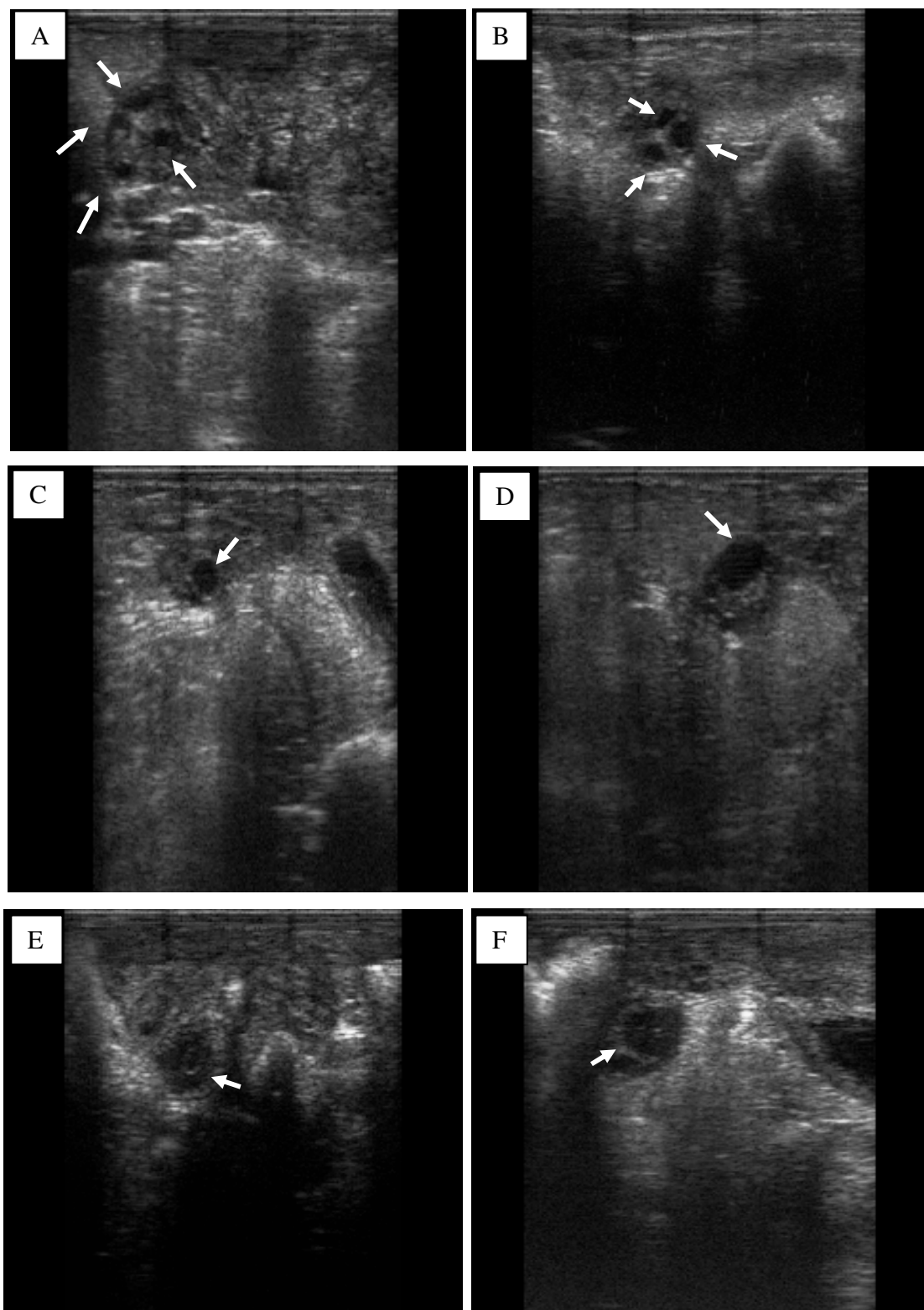


Figura 2 - Imagens ultrassonográficas de ovários em ovelhas, destacando-se: (A) folículos pequenos (2-3 mm); (B e C) folículos grandes (4-5 mm); (D) folículo pré-ovulatório (> 5 mm); (E e F) corpos lúteos.

Uma série de critérios foi definida e adotada durante esta tabulação e análise dos dados foliculares. Onda folicular foi identificada como um grupo de folículos que cresceram a partir de 2 ou 3 mm, sendo que um ou mais atingiram o diâmetro mínimo de 4,5 mm. O dia da emergência foi considerado quando o maior folículo, ainda com 2 ou 3 mm, foi identificado pela primeira vez retrospectivamente. O maior folículo da onda foi aquele que excedeu o tamanho dos demais folículos da mesma onda. Se mais de um alcançaram o mesmo diâmetro máximo, aquele que atingiu primeiro ou permaneceu por mais tempo com este tamanho, foi considerado o maior folículo da onda. O dia do diâmetro máximo foi o primeiro dia em que o folículo atingiu seu maior diâmetro. A duração do crescimento do maior folículo foi o tempo de crescimento a partir de 2-3 mm até seu diâmetro máximo, calculado pela diferença, em horas, entre o momento do menor e maior diâmetros. A taxa de crescimento (mm/dia) foi considerada como a diferença entre o diâmetro máximo e mínimo, do maior folículo, dividido pela duração do seu crescimento. A duração de atresia, do maior folículo, foi o tempo gasto para a regressão a partir do diâmetro máximo até 2 ou 3 mm. A taxa de atresia (mm/dia) foi tomada pela diferença entre o diâmetro máximo e mínimo, do maior folículo, dividido pela duração de sua atresia. Todas estas variáveis foram identificadas e calculadas para cada onda folicular durante os protocolos experimentais.

Para a onda ovulatória, além das variáveis descritas, outras foram computadas. A ovulação foi considerada quando o folículo pré-ovulatório que tinha sido identificado e acompanhado por vários dias, não foi mais identificado. O momento da ovulação foi definido como ocorrido na metade do intervalo entre a última visualização do folículo pré-ovulatório e o exame em que este não foi mais visualizado. O diâmetro ovulatório foi tomado da última mensuração do folículo que ovulou. O encolhimento do folículo ovulatório foi determinado pela diferença entre o diâmetro maior e o ovulatório. A taxa de encolhimento foi calculada pela divisão do encolhimento pela duração deste evento.

O estágio do ciclo estral que os animais se encontravam no início dos tratamentos foi avaliado como um possível efeito para as variáveis. Assim, estabeleceram-se escores (1 – 6) para o *status* no Dia 0 (Dia da inserção do dispositivo CIDR = início do protocolo): 1 – presença de corpo lúteo (CL) + folículo pré-ovulatório (FPO; diâmetro acima de 6 mm); 2 – presença de CL + folículo grande (FG; diâmetro entre 4,0 – 5,75 mm); 3 – presença de CL + folículo pequeno (FP; diâmetro entre 1,5 – 3,75 mm); 4 – ausência de CL + presença de FPO; 5 – ausência de CL + presença de FG; 6 – ausência de CL + presença de FP.

4.5 Colheitas de sangue

Foram realizadas colheitas de sangue imediatamente antes de cada exame ultrassonográfico, a fim de determinar as concentrações séricas de progesterona. As colheitas foram procedidas por punção da veia jugular, com as fêmeas em posição quadrupedal, utilizando-se tubo a vácuo de 10 mL, sem aditivos e identificado com o número do animal e data da colheita. Após este procedimento, o sangue foi centrifugado a 3.000 x g por 15 min. O soro sanguíneo obtido foi transferido para micro-tubos de polipropileno em duas alíquotas, de mesmo volume, devidamente identificados e mantidos a -20°C, para posterior realização das análises hormonais.

4.6 Dosagem hormonal

As amostras de soro foram destinadas à dosagem da progesterona, pela técnica de radioimunoensaio (RIA), seguindo-se as recomendações do fabricante do kit⁷ utilizado. O limite de detecção médio dos ensaios (sensibilidade) foi de 0,005±0,001 ng/mL. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 0,99% e 0,99%, respectivamente.

⁷ COAT A- COUNT Progesterona, Siemens, Estados Unidos da América

4.7 Observações de estro

Ao final dos tratamentos com progesterona, a detecção de estro foi realizada com auxílio de rufiões (machos adultos epididimectomizados) na proporção de 1:10 fêmeas, os quais tiveram a região peitoral manchada com graxa colorida. As identificações das fêmeas marcadas foram realizadas três vezes por dia, durante os quatro dias seguintes à retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, detectando assim o momento inicial do estro e a sincronia entre as fêmeas.

4.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software SAS versão 9.2 (2002-2011). Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o Guide Data Analyse do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformados em conformidade. Os dados de distribuição binomial (manifestação de estro e taxa de ovulação) e os de distribuição contínua (início do estro e momento da ovulação) foram analisados por regressão logística, utilizando o Proc GLIMMIX. As variáveis consideradas para inclusão no modelo foram: grupo, período estacional, interação grupo e período estacional. No modelo de regressão final foram removidas variáveis, baseado no critério estatístico de *Wald* quando $P > 0,20$. Na ausência de interações, foram apresentados os efeitos principais das variáveis. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

Os dados contínuos da dinâmica folicular foram analisados por regressão logística, utilizando o Proc GLIMMIX. As variáveis consideradas para inclusão no modelo foram: grupo, período estacional, interação grupo e período estacional e *status* D0. No modelo de regressão final foram removidas variáveis, baseado no critério estatístico de *Wald* quando $P > 0,20$. Na ausência de interações, foram apresentados os efeitos principais das variáveis. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

Os dados contínuos da concentração sérica de progesterona foram analisados por regressão logística, utilizando o Proc GLIMMIX. Para facilitar a análise estatística, os dados de progesterona foram fracionados em três períodos de acordo com as intervenções dos protocolos: (1) Dia 0 a 7 – colocação do dispositivo intravaginal de progesterona até sua troca; (2) Dia 8 a 15 manhã (M) – troca do dispositivo intravaginal de progesterona até sua remoção; e (3) Dia 15 noite (N) a 30 – período de ovulações e funcionalidade dos corpos lúteos. As variáveis consideradas para inclusão no modelo foram: grupo, período estacional, dia do tratamento, interação grupo e dia do tratamento e; período estacional e *grupo*. No terceiro período foi acrescentado ao modelo o número de ovulações. No modelo de regressão final foram removidas variáveis, baseado no critério estatístico de *Wald* quando $P > 0,20$. Na ausência de interações, foram apresentados os efeitos principais das variáveis. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$. Para respeitar a curva de normalidade os dados foram transformados para raiz quadrada, nos períodos de anestro e transição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dinâmica Folicular

5.1.1 Número de ondas foliculares

As ovelhas apresentaram de duas a cinco emergências de ondas foliculares durante os tratamentos [2 ondas: 4,29% (3/70); 3 ondas: 34,29% (24/70); 4 ondas: 52,86% (37/70); e 5 ondas: 8,57% (6/70) das ovelhas]. O número médio de ondas foliculares no período dos protocolos hormonais de sincronização do estro foi de $3,74 \pm 0,13$ e $3,57 \pm 0,10$ para G – 1CIDR e G – 2CIDR, respectivamente ($P > 0,05$) e $4,04 \pm 0,64$, $3,37 \pm 0,71$ e $3,56 \pm 0,59$ para os períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente ($P > 0,05$). A distribuição do número de ondas foliculares, de acordo com os grupos e períodos estacionais, está apresentada na Figura 3.

A duração dos protocolos hormonais de sincronização de estro, marcado pelo período de permanência do dispositivo intravaginal de progesterona, é correspondente à fase lútea de um ciclo estral, portanto próximo a um intervalo interovulatório. Dessa forma, sugerimos que o número de ondas foliculares que emergiram durante os tratamentos está dentro do esperado, quando considera-se que em um ciclo estral as ovelhas apresentam tipicamente 3 ou 4 ondas foliculares (BARTLEWSKI et al., 2011).

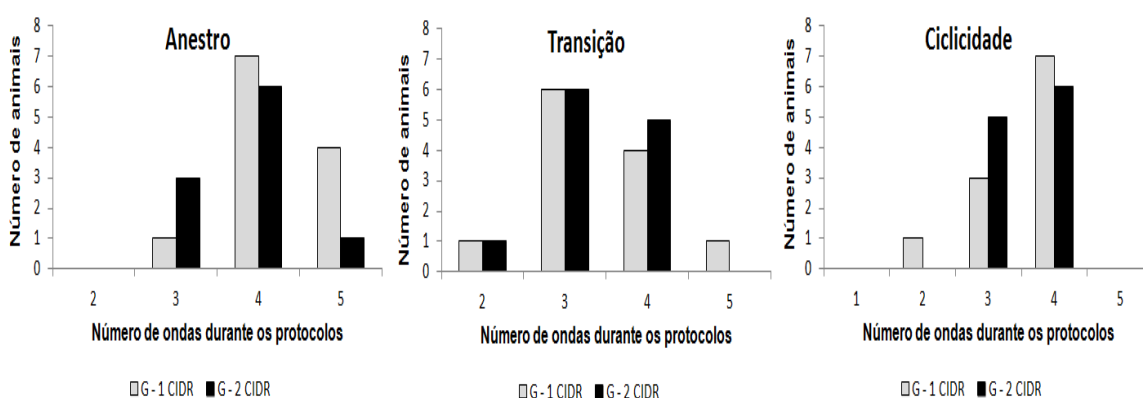


Figura 3 - Distribuição dos animais de acordo com o número de ondas foliculares observadas durante os protocolos hormonais de sincronização do estro, durante os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade.

5.1.2 Emergências de ondas foliculares

Para os dias de emergências das ondas foliculares, não se observou efeitos de grupos e períodos estacionais, nem sua interação (Tabela 2; $P > 0,05$). Entretanto, ao analisar estas variáveis de acordo com o *status* no Dia 0 (dia da inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos) houve efeito para as ondas 1, 2 e 3 (Tabela 3; $P < 0,05$). Variação também foi observada de acordo com o número de ondas foliculares que as fêmeas apresentaram durante os protocolos hormonais de sincronização do estro (Tabela 4, $P < 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios (\pm S.E.M.) dos dias de emergências das ondas foliculares durante protocolos hormonais de sincronização do estro, de acordo com os grupos e estações, em ovelhas da raça Santa Inês (D0 – inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos).

	Dias de Emergências				
	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4	Onda 5
G - 1 CIDR	2,05 \pm 0,42	5,69 \pm 0,42	9,77 \pm 0,42	11,85 \pm 0,39	12,5 \pm 0,40
G - 2 CIDR	2,02 \pm 0,37	5,65 \pm 0,37	10,09 \pm 0,37	12,12 \pm 0,35	12,16 \pm 0,78
ANESTRO	2,01 \pm 0,46	5,11 \pm 0,47	9,33 \pm 0,45	12,27 \pm 0,40	13,50 \pm 0,40
TRANSIÇÃO	2,12 \pm 0,51	5,95 \pm 0,52	10,32 \pm 0,51	11,61 \pm 0,50	11,16 \pm 0,78
CICLICIDADE	1,99 \pm 0,42	5,95 \pm 0,42	10,14 \pm 0,42	12,08 \pm 0,43	-

* $P > 0,05$

A emergência de cada onda folicular é primariamente controlada pelo incremento das concentrações do FSH e resulta no desenvolvimento de um grupo de folículos, dos quais 1-4 irão desenvolver-se seletivamente até um diâmetro pré-ovulatório (≥ 5 mm) antes de iniciar o processo de regressão ou ovulação (GINTHER et al., 1995; EVANS, 2003). Durante o período de avaliação da dinâmica folicular, no presente estudo, os protocolos hormonais restringiram-se a administrações de PGF2 α e progesterona exógenos, a fim de promover um perfil sérico de progesterona que mimetizasse a fase luteal do ciclo estral e de forma similar entre os animais no decorrer do tratamento. Elevadas concentrações desse hormônio isoladamente são incapazes de induzir ou sincronizar diretamente as emergência de ondas foliculares, entretanto, houve um padrão de emergências, ocorrendo a intervalos similares ao relatado em ciclos estrais naturais (3 - 7 dias; MENCHACA et al., 2010), independentemente do protocolo utilizado e período estacional em que foram executados. Vale ressaltar que o intervalo entre

emergência de ondas foliculares reduziu quando o tratamento com progesterona aproximava-se do fim, possivelmente relacionada a menor supressão as concentrações de FSH.

Tabela 3 - Valores médios (\pm S.E.M.) dos dias de emergências das ondas foliculares durante protocolos hormonais de sincronização do estro, de acordo com os *status* folicular no Dia 0 (inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos), em ovelhas da raça Santa Inês.

Dias de Emergências					
Status D0	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4	Onda 5
1	3,05 \pm 0,59 ^a	6,56 \pm 0,60 ^{ab}	10,59 \pm 0,62 ^a	11,46 \pm 0,74	-
2	2,18 \pm 0,47 ^{ab}	6,41 \pm 0,48 ^{ab}	10,18 \pm 0,46 ^a	12,74 \pm 0,41	12,66 \pm 0,78
3	0,06 \pm 1,67 ^b	2,74 \pm 1,70 ^c	10,62 \pm 1,64 ^{ab}	-	-
4	2,25 \pm 0,55 ^{ab}	5,87 \pm 0,56 ^{abc}	9,22 \pm 0,54 ^{ab}	12,0 \pm 0,58	-
5	1,44 \pm 0,30 ^b	5,41 \pm 0,31 ^{bc}	8,72 \pm 0,30 ^b	11,50 \pm 0,26	12,0 \pm 0,40
6	3,52 \pm 0,72 ^a	7,05 \pm 0,76 ^a	10,24 \pm 0,79 ^a	12,64 \pm 1,29	-

Status D0: **1** – Presença de CL + FPO (acima de 6 mm); **2** – Presença de CL + FG (4,0 – 5,75 mm); **3** – Presença de CL + FP (1,5 – 3,75 mm); **4** – Ausência de CL + presença de FPO; **5** – Ausência de CL + presença de FG; **6** – Ausência de CL + presença de FP.

^{abc}Letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05);

Existem dois mecanismos que podem ser responsáveis pela regulação indireta das concentrações e periodicidade de picos de FSH pela progesterona. O primeiro baseia-se na ação do GnRH de estimular a síntese e liberação das gonadotrofinas, FSH e LH, pela hipófise anterior, que sob influência da progesterona o GnRH é liberado em pulsos de baixa frequência, resultando no favorecimento da secreção de FSH em detrimento do LH (NAKAYAMA e ARISAKA, 1997). O segundo fundamenta-se no fato que as concentrações de progesterona podem ditar a taxa de depuração do FSH circulante (BARTLEWSKI

et al., 2011). O FSH é secretado pela hipófise anterior em diferentes isoformas; as menos ácidas produzidas na ausência de progesterona tem a meia-vida mais curta (ULLOA-AGUIRRE et al., 2001). Propõe-se que o mecanismo pelo qual a progesterona induz o pico de FSH e, como consequência, a emergência de onda folicular é devido a seus efeitos na proporção entre as isoformas do FSH (BARTLEWSKI et al., 2011). Os autores observaram que altas concentrações de progesterona podem alterar esta proporção e priorizar as isoformas mais ácidas; as quais diminuem a taxa de depuração do FSH, desencadeando o pico de FSH mais rapidamente.

Tabela 4 - Valores médios (\pm S.E.M.) para os dias de emergências das ondas foliculares, de acordo com o número de ondas foliculares que os animais apresentaram durante protocolos hormonais de sincronização do estro, em ovelhas da raça Santa Inês.

Dias de Emergências						
N° de ondas	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4	Onda 5	Intervalo Médio
2	3,85 \pm 0,95 ^a	10,05 \pm 0,80 ^a	-	-	-	6,33 \pm 0,27
3	2,72 \pm 0,34 ^a	6,68 \pm 0,29 ^b	10,75 \pm 0,29 ^a	-	-	4,05 \pm 0,29
4	1,61 \pm 0,27 ^b	5,41 \pm 0,23 ^c	8,99 \pm 0,22 ^b	12,10 \pm 0,18 ^a	-	3,47 \pm 0,18
5	0,96 \pm 0,72 ^b	3,94 \pm 0,60 ^d	6,93 \pm 0,60 ^c	10,05 \pm 0,50 ^b	12,00 \pm 0,41	2,95 \pm 0,28

^{abc}Letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05);

Nesse contexto, por supressão da secreção da liberação do LH há regressão do(s) folículo(s) dominante(s) e a nova onda folicular emerge em seguida ao pico de FSH. A emergência da nova onda folicular durante o tratamento com progesterona ocorre entre cinco e sete dias (MENCHACA e RUBIANES, 2002; MENCHACA et al., 2007). No presente experimento, a primeira onda folicular sob efeito indireto do tratamento (Onda 2) surgiu em período semelhante. Ademais, confirmando a inabilidade do tratamento com progesterona

de induzir diretamente a emergência de onda folicular, observou-se assincronia dessas variáveis, dependente da população folicular presente ao início dos tratamentos. Atribui-se esse fato ao efeito adicional de acordo com o diâmetro do maior folículo e seu estágio (crescimento ou regressão) sobre a endocrinologia de controle da emergência da nova onda folicular.

O número de ondas foliculares também interferiu nos dias de emergências das ondas foliculares. Além dos aspectos endócrinos mencionados que motivam uma emergência, não há relato da razão que marca a determinação do número de ondas que a fêmea apresentará em um período correspondente ao ciclo estral. Acredita-se que a variabilidade decorra de um caráter individual, entretanto, pode ser observada inconstância entre ciclos de um mesmo animal.

Como proposto no delineamento deste estudo, a definição dos protocolos de superovulação baseou-se nos dados dos dias de emergências das ondas foliculares apresentados. Objetivou-se escolher o protocolo que promoveu maior sincronia entre os dias de emergências para definir os tratamentos superovulatórios iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares, nos diferentes períodos estacionais. Neste contexto, selecionou-se as ondas 2 e 4 como a primeira e última ondas foliculares, respectivamente, à serem superestimuladas. A onda 1 foi descartada por ter emergido antes que os hormônios administrados ao início dos protocolos (i.e. progesterona) tenham promovido qualquer efeito. A onda 5 foi também rejeitada porque alguns animais apresentaram apenas 4 ondas durante os protocolos base para superovulação.

Por não ter sido observado efeito de grupos e período estacional para os dias de emergências, a seleção do dia para iniciar os tratamentos superestimulatórios baseou-se na avaliação da população folicular nos dias próximos as emergências. Há relatos de que a presença de folículos acima de 5 - 6 mm ao início do tratamento superestimulatório possa afetar o desenvolvimento dos demais folículos, comprometendo a resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas (RUBIANES et al., 1995; 1997; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002). Assim, avaliou-se a população de folículos que pudessem promover efeito

à estimulação dos demais, nos dias próximos a emergência da onda 2 (primeira onda a ser superestimulada; Tabela 5) e onda 4 (última onda a ser superestimulada; Tabela 6).

Tabela 5 - Número de folículos de acordo com seus diâmetros nos dias próximos a emergência da primeira onda do protocolo hormonal, em ovelhas da raça Santa Inês, nas estações de anestro, transição e ciclicidade (Dia 0 = inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos hormonais de sincronização do estro).

	Diâmetro folicular					
	5,5 - 5,75 mm			≥ 6 mm		
	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Anestro	9	4	3	5	8	13
Transição	4	1	4	0	2	1
Ciclicidade	6	9	4	7	5	4

A escolha do dia para iniciar o tratamento superestimulatório, na primeira onda, baseou-se no dia que possuía menor número de folículos maiores ou igual a 6 mm. Assim, selecionou-se os Dias 4, 4 e 6, para os períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente.

Para a escolha do protocolo (G – 1 CIDR e G – 2CIDR) e dia para iniciar a superestimulação da última onda empregou-se o mesmo critério, aquele que apresentou menor número de folículos maiores ou igual a 6 mm. No caso de mais de um dia apresentar o mesmo número de folículos de 6 mm, optou-se pelo que exibiu menor somatório de folículos acima de 5,5 mm. Desta forma, selecionou-se no anestro, o Dia 10 do protocolo G – 1CIDR, na transição, o Dia 10 do G – 2CIDR e, na ciclicidade, o Dia 11 do G – 1CIDR.

Tabela 6 - Número de folículos de acordo com seus diâmetros nos dias próximos a emergência da última onda do protocolo hormonal, em ovelhas da raça Santa Inês, nos grupos e estações (Dia 0 = inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos hormonais de sincronização do estro).

		Diâmetro folicular					
		5,5 - 5,75 mm			≥ 6 mm		
		Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 10	Dia 11	Dia 12
Anestro	G - 1CIDR	4	0	0	5	10	10
	G - 2CIDR	2	1	0	7	7	7
Transição	G - 1CIDR	2	3	2	0	2	2
	G - 2CIDR	1	2	3	0	0	1
Ciclicidade	G - 1CIDR	3	3	0	4	2	5
	G - 2CIDR	5	1	1	2	5	5

O padrão de emergência de ondas foliculares observado durante a permanência do dispositivo de progesterona não pôde garantir ausência de folículos com diâmetro igual ou superior a 5-6 mm. Acredita-se que tal condição só seria alcançada adicionando ao tratamento hormônio(s) com ação direta sobre essa população folicular como a exemplo do emprego da associação de estrógeno e progesterona. Esta estratégia é comumente empregada em bovinos a fim de promover a regressão do folículo dominante, seguida pela emergência da nova onda folicular (BÓ et al., 1995). Em ovinos, o uso associado dos fármacos, progestágeno e 17 β -estradiol, promove uma regressão do folículo dominante e supressão inicial das concentrações de FSH, seguida por um pico de curta duração e elevada amplitude, que culmina em uma sincrônica emergência de onda folicular (quatro a seis dias após o tratamento com o estrógeno) em fêmeas em anestro (BARRETT et al., 2002; 2007; 2008; BARTLEWSKI et al., 2008b). Entretanto, o mesmo resultado não foi encontrado em ovelhas cíclicas

(BARTLEWSKI et al., dados não publicados⁸). Em virtude da eficiência ainda não completamente confirmada, e na ausência de outros protocolos hormonais que efetivamente garantam a eliminação de folículos dominantes, permanece ainda uma lacuna para estudo. Por outro lado, acredita-se que a superestimulação com FSH exógeno iniciada próxima a emergência de uma onda folicular, independentemente da presença de folículos da onda anterior, possa garantir resposta ovulatória maior e mais uniforme que tratamentos iniciados, desconsiderando o evento de surgimento da onda. O número de folículos pequenos (2-3 mm de diâmetro) presentes nos ovários ao início do tratamento gonadotrófico é representativo da população folicular responsiva ao FSH exógeno e capaz de crescer até diâmetro ovulatório. Correlação positiva entre o número destes folículos pequenos e a taxa ovulatória, assim como, produção de embriões viáveis foi relatada por GONZÁLES-BULNES et al. (2002) e COGNIÉ et al. (2003).

5.1.3 Padrão de crescimento do maior folículo de cada onda folicular

Não houve interação entre grupo e período estacional para as variáveis relacionadas ao desenvolvimento do maior folículo de cada onda folicular ($P > 0,05$). Desta forma, os efeitos principais estão apresentados (Tabela 7, 8 e 9). Os diâmetros máximos do maior folículo das ondas 1 e 2 foram superiores no protocolo hormonal de sincronização do estro sem troca do dispositivo de progesterona ($P < 0,05$; Tabela 7). Estes diâmetros máximos ocorreram após o evento que diferenciou os dois protocolos (i.e. troca do dispositivo intravaginal de progesterona). Acredita-se que há relação com as concentrações de progesterona no G - 2 CIDR, superiores as do G - 1 CIDR para o mesmo período ($P < 0,05$; Figura 9). A estacionalidade também teve efeito sobre os diâmetros máximos do maior folículo das ondas 2 e 5 ($P < 0,05$). Esta ocorrência pode ser respaldada também pelas concentrações de progesterona, quando o menor diâmetro foi observado para o período estacional que apresentou concentrações de progesterona superiores durante o período entre os Dias 8 e 15 ($P < 0,05$; Figura

⁸ Comunicação pessoal durante estágio de doutorado na "University of Guelph", Guelph, Ontário, Canadá.

9). Assim, as concentrações desse hormônio podem ser correlacionadas de forma inversa ao diâmetro máximo do maior folículo de cada onda. A progesterona influencia por retroalimentação negativa a secreção e pulsatilidade do LH (GOODMAN e KARSH, 1980) e, por sua vez, os pulsos de LH regulam o crescimento final dos folículos antrais (McNEILLY et al., 1991). Uma consequência das baixas concentrações de progesterona é um incremento da frequência de pulsos de LH, o qual está associado com um aumento do diâmetro do maior folículo (dominante; MENCHACA e RUBIANES, 2004).

Ao comparar o diâmetro máximo do maior folículo de cada onda folicular de acordo com o número de ondas que as fêmeas apresentaram durante os protocolos hormonais de sincronização do estro, observou-se diferença apenas para a Onda 2 ($P < 0,05$; Tabela 8).

Tabela 7 - Valores médios (\pm S.E.M.) do diâmetro máximo do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e estações, em ovelhas da raça Santa Inês.

	Diâmetro Máximo do maior folículo da onda (mm)				
	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4	Onda 5
G - 1 CIDR	5,91 \pm 0,29 ^A	6,86 \pm 0,37 ^A	6,42 \pm 0,25 ^a	5,19 \pm 0,37 ^a	6,57 \pm 0,11 ^a
G - 2 CIDR	5,51 \pm 0,24 ^B	6,30 \pm 0,31 ^B	6,48 \pm 0,25 ^a	5,42 \pm 0,35 ^a	6,75 \pm 0,27 ^a
ANESTRO	5,97 \pm 0,31 ^a	7,31 \pm 0,42 ^a	6,28 \pm 0,30 ^a	5,26 \pm 0,38 ^a	5,16 \pm 0,10 ^b
TRANSIÇÃO	5,37 \pm 0,30 ^a	6,42 \pm 0,45 ^{ab}	6,42 \pm 0,31 ^a	4,97 \pm 0,42 ^a	8,59 \pm 0,29 ^a
CICLICIDADE	5,82 \pm 0,28 ^a	6,05 \pm 0,35 ^b	6,63 \pm 0,31 ^a	5,70 \pm 0,42 ^a	-

* Letras diferentes na mesma coluna e mesma categoria (grupo ou período estacional) indicam diferença ($P < 0,05$).

Tabela 8 - Valores médios (\pm S.E.M.) do diâmetro máximo do maior folículo de cada onda folicular de acordo com o número de ondas , em ovelhas da raça Santa Inês.

Diâmetro Máximo do maior folículo da onda (mm)					
N° de onda	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4	Onda 5
2	6,80 \pm 1,73 ^a	6,45 \pm 1,01 ^a	-	-	-
3	5,67 \pm 0,14 ^a	6,97 \pm 0,31 ^a	6,29 \pm 0,27 ^a	-	-
4	5,80 \pm 0,17 ^a	5,99 \pm 0,21 ^b	6,59 \pm 0,23 ^a	5,73 \pm 0,18 ^a	-
5	6,20 \pm 0,21 ^a	6,32 \pm 0,51 ^{ab}	6,18 \pm 0,74 ^a	5,90 \pm 0,54 ^a	5,39 \pm 0,51

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05).

Os dias de ocorrência do diâmetro máximo do maior folículo da onda não diferiram entre grupos, independentemente da onda folicular (P>0,05; Tabela 9). Entretanto, houve variação entre períodos estacionais para a onda 2 e 4 (P<0,05).

Quanto a duração do período de crescimento do maior folículo das ondas, não se observou também variação entre grupos (P>0,05; Tabela 10). Diferenças entre períodos estacionais foi observada apenas para a onda 2 (P<0,05). A menor duração desse evento na período estacional de ciclicidade está associada ao menor diâmetro máximo do maior folículo da onda em relação os outros períodos estacionais e o somatório de informações relatadas para a onda (i.e. emergência mais tardia e dia do diâmetro máximo do maior folículo). Estes últimos embora não diferiram dos demais períodos estacionais apresentaram valores menores.

Para a variável taxa de crescimento do maior folículo de cada onda folicular, não se observou efeitos de grupos e períodos estacionais (Tabela 11; P>0,05).

Tabela 9 - Valores médios (\pm S.E.M.) do dia do diâmetro máximo do maior folículos de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês. (D0 – inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos).

Dias do Diâmetro Máximo do maior folículo da onda					
	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4	Onda 5
G - 1 CIDR	7,38 \pm 0,51 ^a	12,63 \pm 0,84 ^a	14,52 \pm 0,37 ^a	15,59 \pm 0,24 ^a	16,44 \pm 0,35 ^a
G - 2 CIDR	7,25 \pm 0,51 ^a	12,22 \pm 0,74 ^a	15,15 \pm 0,36 ^a	15,97 \pm 0,25 ^a	15,56 \pm 0,72 ^a
ANESTRO	7,64 \pm 0,63 ^a	12,99 \pm 0,93 ^a	14,05 \pm 0,44 ^a	16,03 \pm 0,26 ^a	15,94 \pm 0,35 ^a
TRANSIÇÃO	6,87 \pm 0,61 ^a	12,53 \pm 1,03 ^a	15,18 \pm 0,45 ^a	15,04 \pm 0,36 ^b	16,06 \pm 0,72 ^a
CICLICIDADE	7,46 \pm 0,63 ^a	11,76 \pm 0,84 ^a	15,26 \pm 0,45 ^a	16,25 \pm 0,30 ^a	-

* Letras diferentes na mesma coluna e mesma categoria (grupo ou período estacional) indicam diferença ($P < 0,05$).

Tabela 10 - Valores médios (\pm S.E.M.) da duração do período de crescimento do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.

Duração do período de crescimento do maior folículo da onda (dias)				
	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4
G - 1 CIDR	5,38 \pm 0,35 ^a	6,43 \pm 0,51 ^a	5,32 \pm 0,32 ^a	3,88 \pm 0,31 ^a
G - 2 CIDR	5,23 \pm 0,41 ^a	6,19 \pm 0,42 ^a	5,42 \pm 0,38 ^a	3,99 \pm 0,23 ^a
ANESTRO	5,69 \pm 0,57 ^a	7,39 \pm 0,64 ^a	5,21 \pm 0,51 ^a	3,84 \pm 0,28 ^a
TRANSIÇÃO	4,79 \pm 0,29 ^a	5,94 \pm 0,49 ^{ab}	5,63 \pm 0,36 ^a	3,85 \pm 0,36 ^a
CICLICIDADE	5,48 \pm 0,50 ^a	5,59 \pm 0,52 ^b	5,28 \pm 0,41 ^a	4,10 \pm 0,39 ^a

* Letras diferentes na mesma coluna e mesma categoria (grupo ou período estacional) indicam diferença ($P < 0,05$).

Tabela 11 - Valores médios (\pm S.E.M.) da taxa de crescimento do maior folículo de cada onda folicular de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.

Taxa de crescimento do maior folículo da onda (mm/dia)				
	Onda 1	Onda 2	Onda 3	Onda 4
G - 1 CIDR	0,81 \pm 0,06	0,73 \pm 0,05	0,76 \pm 0,07	0,75 \pm 0,09
G - 2 CIDR	0,77 \pm 0,05	0,62 \pm 0,04	0,75 \pm 0,06	0,83 \pm 0,09
ANESTRO	0,73 \pm 0,06	0,66 \pm 0,05	0,78 \pm 0,07	0,79 \pm 0,10
TRANSIÇÃO	0,86 \pm 0,08	0,68 \pm 0,06	0,71 \pm 0,08	0,77 \pm 0,12
CICLICIDADE	0,78 \pm 0,05	0,69 \pm 0,05	0,78 \pm 0,07	0,81 \pm 0,10

* P>0,05

5.1.4 Onda ovulatória

Não houve interação entre grupo, período estacional e *status* folicular ao início do protocolo, para as variáveis relacionadas ao desenvolvimento do maior folículo da onda ovulatória. Desta forma, os efeitos principais estão apresentados (Tabela 12).

O dia de emergência da onda ovulatória diferiu entre grupos, período estacional e *status* folicular ao início dos protocolos (P<0,05). Tal evento ocorreu mais cedo quando não realizou-se a substituição do dispositivo de progesterona (G - 1 CIDR), da mesma forma, quando o protocolo foi realizado durante o período estacional de anestro. Ao avaliar o efeito do *status*, verificou-se emergência mais tardia quando os animais apresentavam condição de ausência de corpo lúteo e presença de folículos, pré-ovulatório e grande, ao início do tratamento de sincronização do estro (*status* 4 e 5). Todas estas condições sugerem que as menores concentrações de progesterona possam estar associadas à emergência folicular mais precoce, entretanto, contrariam os dois mecanismos apontados para a regulação das concentrações e periodicidade de picos de FSH pela

progesterona. Pelas duas cadeias de evento as altas concentrações de progesterona favorecem a pico de FSH pré-emergência, por liberação do GnRH em pulsos de baixa frequência (NAKAYAMA e ARISAKA, 1997) ou por diminuir a taxa de depuração das isoformas do FSH (BARTLEWSKI et al., 2011).

Tabela 12 - Valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis relacionadas ao desenvolvimento do(s) folículo(s) ovulatório(s) de acordo com os grupos e estações e *status* folicular ao início do protocolo, em ovelhas da raça Santa Inês. (D0 – inserção do dispositivo CIDR; início dos protocolos).

	Dia Emergência	Taxa de Crescimento (mm/dia)	Duração Crescimento (horas)	Diâmetro Máximo (mm)	Diâmetro Ovulatório (mm)	Encolhimento Pré-ovulação (mm/dia)
G - 1 CIDR	8,28 \pm 0,55 ^a	0,70 \pm 0,04 ^a	195,00 \pm 11,28 ^A	8,10 \pm 0,22 ^a	7,45 \pm 0,22 ^a	-1,21 \pm 0,22 ^a
G - 2 CIDR	9,23 \pm 0,45 ^b	0,71 \pm 0,04 ^a	175,70 \pm 9,92 ^B	9,23 \pm 0,45 ^b	7,34 \pm 0,19 ^a	-0,72 \pm 0,20 ^b
ANESTRO	7,08 \pm 0,64 ^a	0,67 \pm 0,05 ^a	216,11 \pm 12,38 ^a	8,29 \pm 0,24 ^a	7,71 \pm 0,24 ^a	-1,01 \pm 0,25 ^a
TRANSIÇÃO	9,10 \pm 0,61 ^b	0,68 \pm 0,05 ^{ab}	177,38 \pm 13,67 ^b	7,72 \pm 0,26 ^{ab}	7,59 \pm 0,26 ^a	-0,63 \pm 0,27 ^a
CICLICIDADE	9,89 \pm 0,48 ^b	0,78 \pm 0,04 ^b	162,57 \pm 11,28 ^b	7,58 \pm 0,21 ^b	6,89 \pm 0,22 ^b	-1,26 \pm 0,23 ^a
STATUS 1	6,40 \pm 0,75 ^a	0,65 \pm 0,06 ^a	225,74 \pm 15,96 ^a	8,87 \pm 0,31 ^a	8,66 \pm 0,30 ^a	-0,21 \pm 0,32 ^a
STATUS 2	8,89 \pm 0,49 ^{ab}	0,72 \pm 0,05 ^a	181,19 \pm 12,69 ^b	7,79 \pm 0,23 ^{ab}	7,53 \pm 0,24 ^b	-0,51 \pm 0,25 ^a
STATUS 3	9,24 \pm 2,24 ^{ab}	0,51 \pm 0,18 ^a	189,15 \pm 45,16 ^{ab}	7,59 \pm 0,88 ^{ab}	6,66 \pm 0,86 ^b	-2,98 \pm 0,90 ^b
STATUS 4	9,59 \pm 0,59 ^b	0,89 \pm 0,06 ^a	162,86 \pm 14,81 ^b	8,10 \pm 0,27 ^{ab}	7,81 \pm 0,28 ^b	-0,46 \pm 0,30 ^a
STATUS 5	9,25 \pm 0,32 ^b	0,74 \pm 0,03 ^a	171,20 \pm 8,13 ^b	7,49 \pm 0,15 ^b	6,92 \pm 0,15 ^b	-0,70 \pm 0,17 ^a
STATUS 6	8,86 \pm 0,87 ^{ab}	0,72 \pm 0,08 ^a	181,97 \pm 19,98 ^{ab}	7,40 \pm 0,37 ^b	6,78 \pm 0,39 ^b	-0,94 \pm 0,40 ^a

Status D0: **1** – Presença de CL + FPO (acima de 6 mm); **2** – Presença de CL + FG (4,0 – 5,75 mm); **3** – Presença de CL + FP (1,5 – 3,75 mm); **4** – Ausência de CL + presença de FPO; **5** – Ausência de CL + presença de FG; **6** – Ausência de CL + presença de FP.

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05);

O perfil de crescimento do folículo ovulatório também diferenciou entre os efeitos, grupos, períodos estacionais e *status*. A duração do crescimento do folículo ovulatório foi superior no G - 1 CIDR ($P < 0,05$), enquanto o maior diâmetro foi observado no G - 2 CIDR. Esses achados corroboram com a destacada discussão sobre o efeito de concentrações subluteais de progesterona ($< 2 \text{ ng/mL}$) à saúde folicular; quando há correlação com um excessivo crescimento e persistência do folículo dominante (VIÑALES et al., 1999), incrementando a idade do folículo ovulatório (JOHNSON et al., 1996). A última mensuração do diâmetro folicular que precedeu o evento da ovulação demonstra que o diâmetro ovulatório não diferiu entre os tratamentos. Notou-se que há uma redução do diâmetro folicular horas antes do seu rompimento ovulatório, independentemente dos efeitos analisados. Maior taxa de encolhimento foi mostrada entre as fêmeas que receberam o protocolo 1 CIDR. Não há descrição na literatura de que a taxa de encolhimento possa estar relacionada a qualidade do folículo ovulatório.

Quanto ao efeito dos períodos estacionais, pôde-se acompanhar menor diâmetro máximo e ovulatório, bem como, menor período de crescimento e, conseqüentemente, menor taxa de crescimento para os folículos ovulatórios provenientes dos protocolos realizados durante o período estacional de ciclicidade. Os achados ao serem avaliados conjuntamente às concentrações de progesterona no período entre os Dias 8 e 15 dos tratamentos hormonais (Figura 9), reforçam a relação entre alta concentração de progesterona e menor diâmetro do folículo dominante, e corroboram com MENCHACA e RUBIANES (2004). O mesmo justifica o fato de que animais que apresentavam *status* folicular ao início dos tratamentos indicativos de não ciclicidade, ou seja, ausência de corpos lúteos e folículos pré-ovulatórios (i.e. *status* 5 e 6) apresentaram diâmetros foliculares, máximo e ovulatório, superiores as fêmeas com *status* diferentes.

5.2 Progesterona

Os perfis séricos da progesterona nos dias de observações estão apresentados na Figura 4, de acordo com os grupos e períodos estacionais.

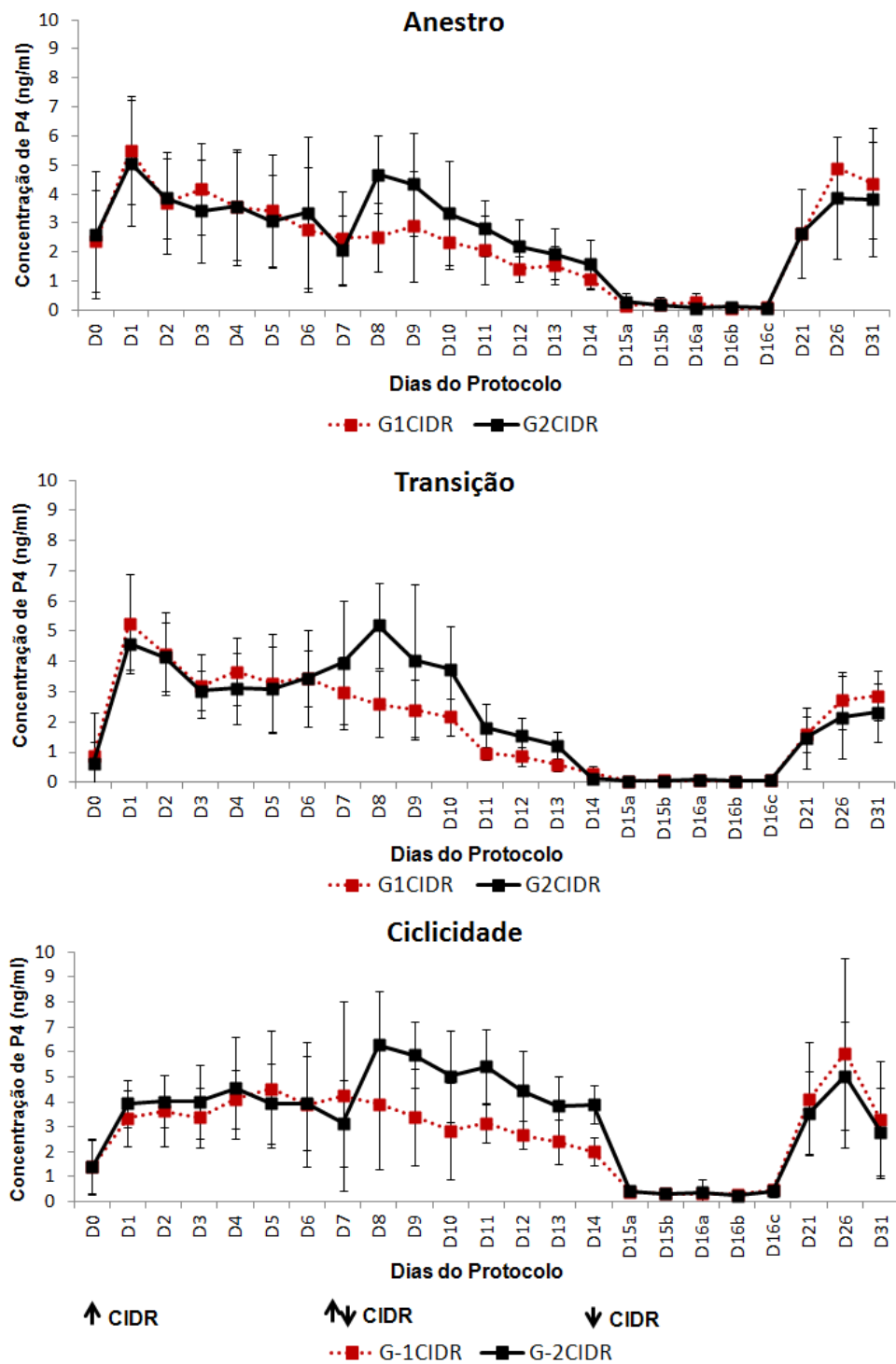


Figura 4 – Perfil das concentrações séricas médias de progesterona (P4) de acordo com os grupos experimentais (G – 1CIDR e G – 2CIDR) e períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade) em ovelhas da raça Santa Inês.

Como previsto pela análise estatística, os dados da concentração de progesterona foram fracionados em três períodos de acordo com as intervenções dos protocolos: (1) Dia 0 a 7 – colocação do dispositivo de progesterona até sua troca; (2) Dia 8 a 15 M – troca do dispositivo de progesterona até sua remoção; e (3) Dia 15N a 30 – período de ovulações e funcionalidade dos corpos lúteos.

No primeiro período, não houve interação (grupo*dia do protocolo e período estacional*grupo). Dessa forma, apresentam-se os efeitos principais: período estacional (Figura 5), grupo (Figura 6) e dias do protocolo (Figura 7). A média da concentração sérica de progesterona entre D0 e D7 não diferiu entre os períodos estacionais ($P>0,05$). O mesmo foi observado para esta variável quando avaliado o efeito dos grupos ($P>0,05$). A ausência de variação entre os protocolos hormonais foi esperado pois esses diferiram apenas após o Dia 7 (i.e. troca do dispositivo intravaginal de progesterona).

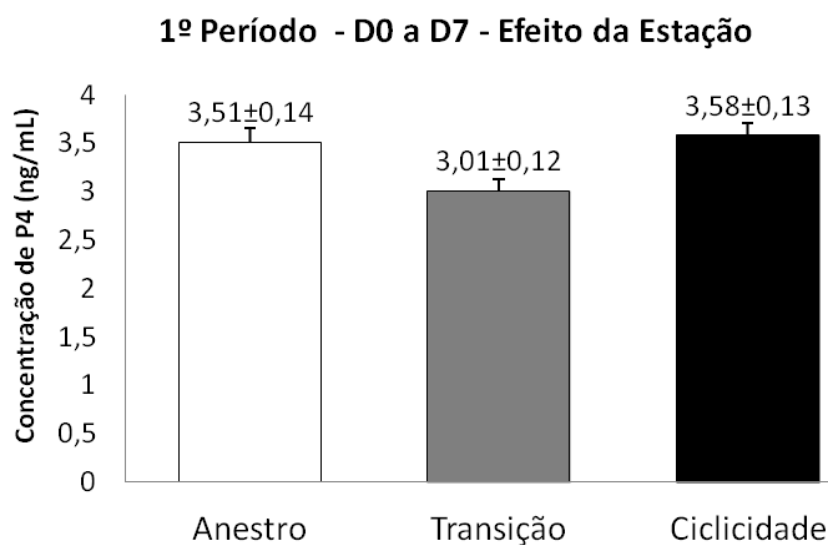


Figura 5 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de Progesterona (P4) no período entre o Dia 0 a 7 dos protocolos de acordo com o efeito principal do período estacional (anestro, transição e ciclicidade) *Letras diferem entre si ($P<0,05$).

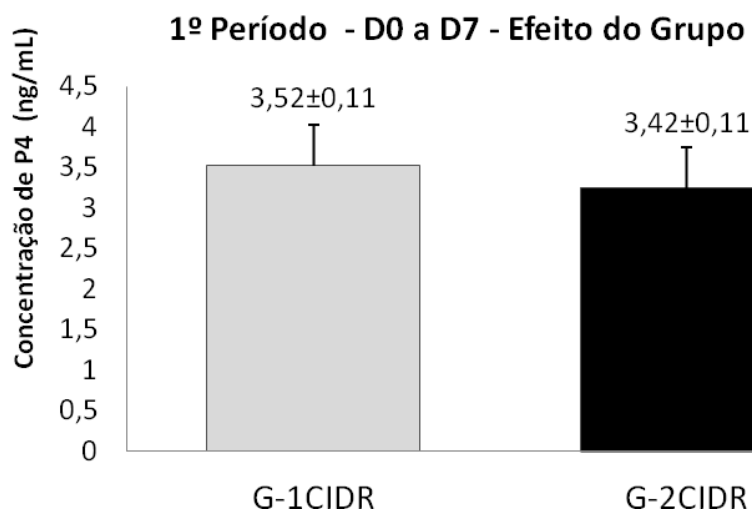


Figura 6 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 0 a 7 dos protocolos de acordo com o efeito principal do grupo (G – 1CIDR e G – 2CIDR). *P>0,05.

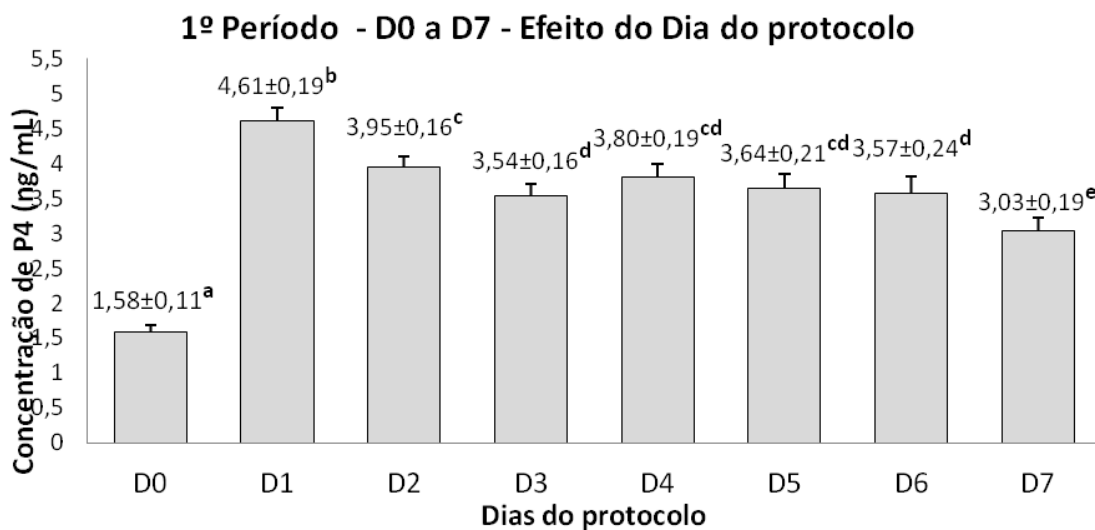


Figura 7 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 0 a 7 dos protocolos de acordo com o efeito principal do Dia dos protocolos. *Letras diferem entre si (P<0,05).

O perfil das concentrações deste hormônio encontrado neste primeiro período foi de incremento entre os Dias 0 e 1, com subsequente decréscimo progressivo até o Dia 7. Segundo RUBIANES et al. (1998), as concentrações entre os primeiros três ou quatro dias após a inserção do dispositivo CIDR atinge valores superiores ao observado durante a metade da fase luteal fisiológica (> 5 ng/mL). No presente experimento, os valores foram inferiores, entretanto, similares as concentrações de progesterona provenientes a metade da fase luteal (D26; Figura 12) dos corpo lúteos formados após os protocolos de sincronização de estro.

No período entre os dias 8 e 15 do protocolo, houve interação entre grupo e dia do protocolo (Figura 8). Houve continuação do decréscimo progressivo das concentrações de progesterona para os animais submetidos ao G - 1 CIDR. A substituição do dispositivo CIDR, no G - 2 CIDR, promoveu incremento das concentrações imediatamente a sua realização, como o observado após a inserção do primeiro dispositivo de progesterona ao início dos protocolos hormonais. Ademais, verificou-se diminuição desses valores até o final do protocolo; suas concentrações foram sempre superiores ao G - 1 CIDR. A troca do dispositivo CIDR proporcionou concentrações de progesterona supraluteais (> 2 ng/mL) até o final do protocolo de sincronização do estro (D14), assim potencialmente eliminaria possíveis efeitos sobre a qualidade folicular e oócitaria.

O efeito principal do período estacional está apresentado na Figura 9. A média das concentrações séricas de progesterona para o período foi superior para o período estacional de ciclicidade ($P < 0,05$).

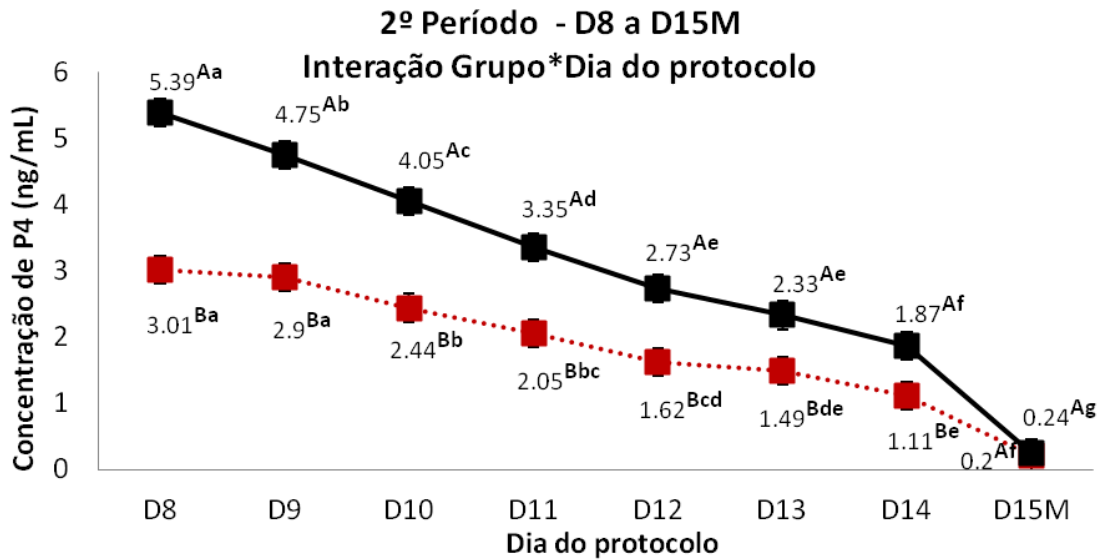


Figura 8 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 8 a 15 dos protocolos de acordo com a interação grupo e dias do protocolo. *Letras maiúsculas diferem entre grupo; #Letras minúsculas diferem entre dias do protocolo ($P < 0,05$).

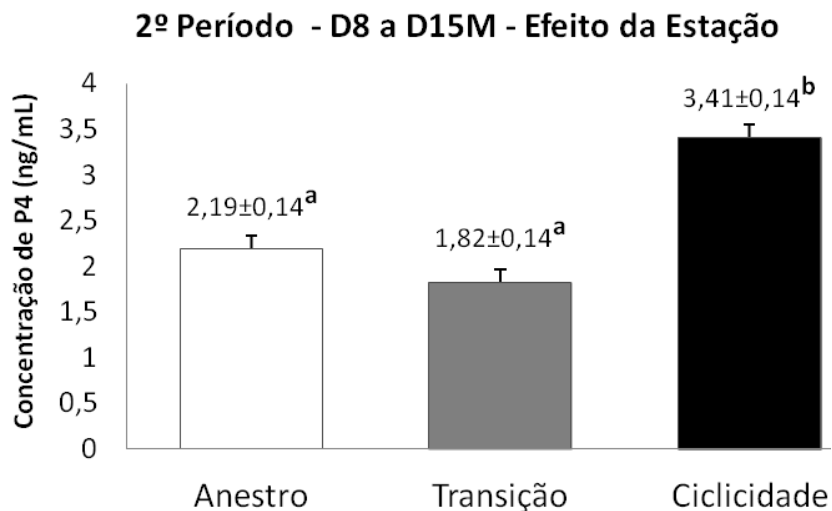


Figura 9 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 8 a 15 dos protocolos de acordo com o efeito principal do período estacional. *Letras diferem entre si ($P < 0,05$).

No terceiro período (entre os dias 15 e 30 dos protocolos), não houve interação (grupo*dia do protocolo e período estacional*grupo). Apresentam-se os efeitos principais: período estacional (Figura 10), grupo (Figura 11) e dias do protocolo (Figura 12). Menor concentração de progesterona para o período foi observada quando os animais foram submetidos aos tratamentos durante o período de transição ($P < 0,05$). Nenhuma variação foi verificada entre os protocolos (1CIDR e 2 CIDR). Estes resultados podem ser confrontados com o número de ovulações por animal. A menor prolificidade (taxa ovulatória) observada para o período de transição (Tabela 11) pode estar relacionada as menores concentrações para este período estacional. Da mesma forma, a ausência de diferença entre grupos para as duas variáveis (i.e. concentração de progesterona e número de ovulações por animal) confirmam a associação.

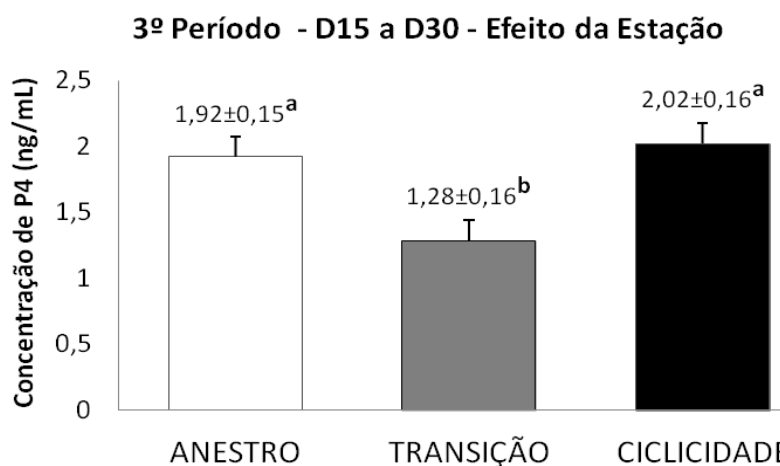


Figura 10 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre os dias 15 a 30 dos protocolos de acordo com o efeito principal do período estacional (anestro, transição e ciclicidade). *Letras diferem entre si ($P < 0,05$).

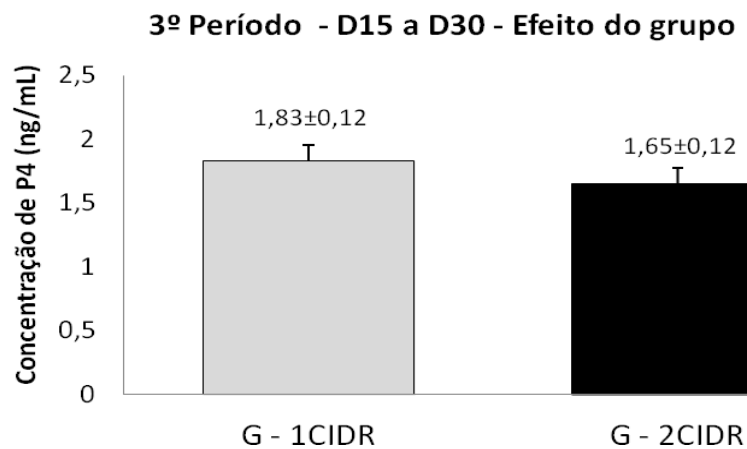


Figura 11 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre os dias 15 a 30 dos protocolos de acordo com o efeito principal do grupo (G – 1CIDR e G – 2CIDR). * $P > 0,05$.

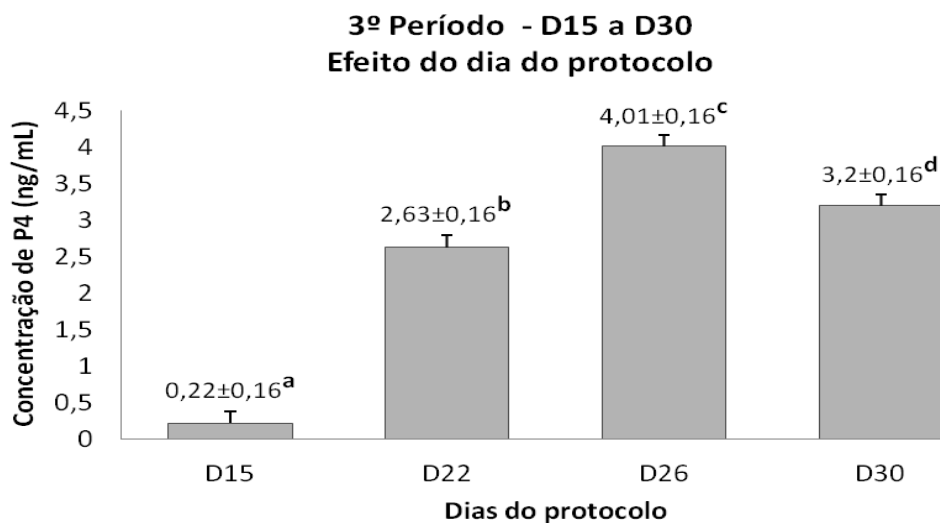


Figura 12 – Valores médios (\pm S.E.M.) das concentrações de progesterona (P4) entre o Dia 15 a 30 dos protocolos de acordo com o efeito principal do Dia dos protocolos. *Letras diferem entre si ($P < 0,05$).

O perfil sérico de progesterona observado neste período, marca a funcionalidade dos corpos lúteos formados. Os dias 22, 26 e 30 correspondem ao

quinto, décimo e décimo quinto dia após o processo ovulatório. Assim, nota-se que a maior produção de progesterona ocorre por volta do décimo dia (i.e. D26 do protocolo). Essas informações assemelham-se aos ciclos estrais naturais, quando as concentrações do hormônio incrementam a partir do terceiro dia após a ovulação, atingindo a maior concentração por volta do 12º dia, com subsequente decréscimo até o nadir antes da próximo estro e ovulação (BARTLEWSKI et al., 1999).

5.3 Manifestações de estro

Não houve interação entre grupo e período estacional para as variáveis de estro. Desta forma, os efeitos principais estão apresentados. Um total de 94,28% das ovelhas manifestou estro ao final dos protocolos de sincronização do estro. Não houve efeito entre grupos ($P= 1,00$) e períodos estacionais ($P=0,99$; Tabela 13).

O intervalo entre o final do tratamento (retirada do dispositivo – CIDR) e início do estro diferiu entre grupos, sendo superior no G – 2CIDR ($P<0,05$). Houve efeito, também, entre períodos estacionais, quando se observou maior intervalo durante o período de transição ($P<0,05$; Tabela 13).

Tabela 13 - Valores médios (\pm S.E.M.) para o intervalo, em horas, entre final dos protocolos hormonais de sincronização do estro (retirada do dispositivo – CIDR) e o início de estro (FT-IE) de acordo com os grupos e estações, em ovelhas da raça Santa Inês.

	Manifestação de estro (%)	FT-IE (horas)
G - 1CIDR	94,28 \pm 0,04	45,87 \pm 2,43 ^a
G - 2CIDR	94,28 \pm 0,04	51,33 \pm 2,17 ^b
ANESTRO	91,30 \pm 0,06	43,42 \pm 2,11 ^a
TRANSIÇÃO	95,83 \pm 0,04	57,56 \pm 3,13 ^b
CICLICIDADE	95,65 \pm 0,04	44,18 \pm 2,11 ^a

^{ab}Letras diferem dentro das categorias (grupos e estações) ($P<0,05$).

5.4 Ovulações

Todas as ovelhas ovularam ao final dos protocolos de sincronização. Não houve interação entre grupo e período estacional para as variáveis de ovulação. Desta forma, os efeitos principais estão apresentados (Tabela 14).

As variáveis, momento da ovulação, número de ovulações, diâmetro ovulatório não diferiram entre grupos ($P>0,05$), entretanto, foi observada variação entre períodos estacionais ($P<0,05$). O intervalo entre o início do estro e o momento ovulatório não sofreu efeito de grupos e períodos estacionais ($P>0,05$).

Tabela 14 - Valores médios (\pm S.E.M.) para momento ovulatório, número de ovulações, diâmetro ovulatório e intervalo entre início do estro e momento ovulatório de acordo com os grupos (protocolos hormonais de sincronização do estro) e estações (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.

	Momento ovulatório (h)	Número de ovulações	Diâmetro ovulatório (mm)	Intervalo Estro-Ovulação (h)
G - 1CIDR	72,00 \pm 2,06 ^a	1,31 \pm 0,09 ^a	7,45 \pm 0,22 ^a	29,39 \pm 1,88 ^a
G - 2CIDR	74,17 \pm 2,01 ^a	1,25 \pm 0,10 ^a	7,34 \pm 0,19 ^a	26,48 \pm 1,99 ^a
ANESTRO	68,00 \pm 1,37 ^b	1,34 \pm 0,11 ^{ab}	7,71 \pm 0,24 ^a	28,19 \pm 1,68 ^a
TRANSIÇÃO	79,66 \pm 1,73 ^a	1,04 \pm 0,04 ^b	7,59 \pm 0,26 ^a	25,91 \pm 2,78 ^a
CICLICIDADE	71,30 \pm 3,34 ^b	1,47 \pm 0,16 ^a	6,89 \pm 0,22 ^b	29,81 \pm 2,46 ^a

^{ab}Letras diferem entre períodos estacionais ($P<0,05$).

6. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos achados desta investigação permitiu concluir que:

- Predominantemente ocorreram três ou quatro ondas foliculares durante os protocolos hormonais base para a superovulação;

- Os dias de emergências das ondas foliculares foram influenciados pelo número de ondas foliculares e a população ovariana presente ao início dos tratamentos;

- A população folicular presente nos ovários ao dia do surgimento de uma onda folicular não se restringiu a folículos em emergência. Houve registro, em alguns animais, de folículos dominantes de ondas anteriores;

- Na definição dos protocolos superovulatórios, selecionou-se as ondas 2 e 4 como a primeira e última ondas foliculares à serem superestimuladas;

- Fixou-se os Dias 4, 4 e 6 para iniciar o tratamento superestimulatório com FSH próximo a emergência da primeira onda folicular, nos períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente;

- Para a superovulação iniciada próximo a emergência da última onda folicular, recomenda-se o Dia 10 do protocolo G - 1 CIDR no período de anestro, o Dia 10 do G - 2 CIDR na transição e o Dia 11 do G - 1 CIDR na ciclicidade;

- O perfil das concentrações de progesterona mostrou incremento entre os Dias 0 e 1 com subsequente decréscimo progressivo. Para os animais submetidos ao protocolo com a troca do dispositivo CIDR houve uma nova elevação da concentrações após a substituição seguida por queda progressiva;

- O protocolo hormonal de sincronização do estro com troca do dispositivo CIDR permitiu que as concentrações séricas de progesterona permanecesse supraluteais até o final do tratamento.

Capítulo III

Viabilidade da superovulação iniciada na emergência da primeira e última ondas foliculares, em ovelhas da raça Santa Inês, nos períodos de ciclicidade, transição e anestro

VIABILIDADE DA SUPEROVULAÇÃO INICIADA NA EMERGÊNCIA DA PRIMEIRA E ÚLTIMA ONDAS FOLICULARES, EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS, NOS PERÍODOS ESTACIONAIS DE CICLICIDADE, TRANSIÇÃO E ANESTRO

RESUMO - Neste experimento foram utilizadas 60 novas ovelhas da raça Santa Inês, sendo 20 para cada período estacional (ciclicidade, transição e anestro) e 10 para cada grupo. Os animais foram submetidos concomitantemente aos tratamentos hormonais de superovulação iniciados próximos a emergência da primeira (G-PrimeiraOnda) ou última (G-ÚltimaOnda) ondas foliculares. O estro foi sincronizado com um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; CIDR), o qual permaneceu por 6, 6 ou 8 dias para G-PrimeiraOnda e 12, 12 ou 13 dias para G-ÚltimaOnda, nos períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente. O G-ÚltimaOnda realizado durante o período de transição diferiu, ainda, pela substituição do CIDR por um novo, no D7. O tratamento superestimulatório com FSHp consistiu na administração de 200 mg fracionadas em 8 aplicações intervaladas de 12 horas (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 e 10 mg), iniciando dois dias antes da remoção do CIDR. Ao final do tratamento com P4 foram administradas 200 UI de eCG e 37,5 µg de um análogo da PGF2α (D- Cloprostenol), i.m., em todas as ovelhas. Exames ultrassonográficos dos ovários foram realizados diariamente, por via transretal, durante os períodos próprios de observação (da aplicação a remoção do dispositivo) quanto à dinâmica folicular. A ovulação foi identificada acompanhando por este método diagnóstico, a cada 8 horas. Os acasalamentos ocorreram por monta natural. Após sete dias da remoção do CIDR os úteros foram lavados para colheita de embriões. Os dados foram analisados por regressão logística utilizando o Proc GLIMMIX do SAS ($P < 0,05$). A taxa de ovulação diferiu entre grupos apenas para o período de ciclicidade ($97,90 \pm 1,45\%$ e $88,55 \pm 4,45\%$ para G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda, respectivamente; $P < 0,05$). Comportamento semelhante foi observado para a variável número de ovulações ($17,00 \pm 2,31$ e $12,50 \pm 2,62$ para G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda no período de

ciclicidade; $P < 0,05$). O número de embriões viáveis não sofreu efeito do protocolo ou período estacional. Houve alta variabilidade para as repostas superovulatórias e de produção de embriões.

Palavras-chave: dinâmica folicular; progesterona; embrião; ovinos.

VIABILITY OF THE SUPEROVULATION STARTED IN THE EMERGENCE OF THE FIRST AND LAST FOLLICULAR WAVE ON BREEDING, TRANSITION AND NON-BREEDING SEASON IN SANTA INES EWES

ABSTRACT – In the present experiment 60 new Santa Ines ewes were used , 20 for each season (breeding, transition and non-breeding) and 10 for each group received one of two superovulatory protocols according to the time that FSH treatment were initiated (G-FirstWave and G-LastWave). Ewes were treated with P4 device (CIDR) for 6, 6 or 8 days for G-FirstWave and for 12, 12 or 13 days for G-LastWave in non-breeding, transition and breeding, respectively. Additionally, in G-LastWave performed during the transition season differed by CIDR replacement on D7. All ewes received two injections of 37.5 μg of a $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue (D-cloprostenol) on D0 and at CIDR removal. The superovulatory regimen consisted of eight i.m. injections of pFSH administrated twice daily (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 and 10 mg of pFSH). A single i.m. dose of 200 IU of eCG was given concurrently the CIDR removal. Ewes were mated by a fertile ram. Embryo recovery were accomplished 7 days after CIDR withdrawal. Ultrasonographic exam was performed daily between D0 and D14 and, every 8 hours until D19. Data were analyzed by GLIMMIX using the SAS ($P < 0.05$). Addittionaly, were realized the embryo assessment. Data were analyzed using Proc GLIMMIX by SAS ($P < 0.05$). The ovulation rate was different between groups only in breeding season (97.90 ± 1.45 vs. 88.55 ± 4.45 for G-FirstWave and G-LastWave, respectively; $P < 0.05$). The same behavior was observed for number of ovulation (17.00 ± 2.31 vs. 12.50 ± 2.62 for G-FirstWave and G-LastWave in breeding season, respectively;

$P < 0.05$). The number of viable embryo had no effect of the protocols or season. There was high variability on superovulatory response and embryo yield.

Keywords: follicular dynamics; progesterone; embryo; sheep.

1. INTRODUÇÃO

No contexto da superovulação em ovinos, a alta variabilidade das respostas ovulatórias e de produção de embriões é o principal entrave para o aumento da eficiência dos programas de MOTE. Expressivo destaque tem sido dado pela comunidade científica aos efeitos prejudiciais da dominância folicular na resposta superovulatória (OLIVEIRA, 2011a). Tratamentos de estimulação gonadotrófica iniciados na ausência de um folículo dominante têm resultado em melhores taxas de recrutamento folicular, ovulação e produção de embriões (RUBIANES et al., 1995; 1997; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002). A evidência de que o folículo dominante possa exercer domínio, não só por vias sistêmicas, mas também por fatores locais, reforça a necessidade de garantir a ausência de folículos grandes no início da superestimulação (MENCHACA et al., 2010).

Já existem algumas estratégias focadas em começar o tratamento superovulatório na ausência de um folículo dominante em pequenos ruminantes. Os métodos estão voltados em iniciar a superestimulação gonadotrófica próxima a emergência da onda folicular por sincronização de uma nova onda (RUBIANES & MENCHACA, 2006; BARTLEWSKI et al., 2008) ou pela indução da ablação/regressão do folículos dominante (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004). Embora alguns avanços estejam sendo conquistados, roga-se por mais estudos na busca por tratamentos que efetivamente beneficie as repostas superovulatórias e produção de embriões em ovinos.

Ademais, acredita-se que a previsibilidade dos dias de emergências das ondas foliculares em protocolos hormonais base para a superovulação em ovinos terá grande relevância. Consoante a esse fato, faz-se fundamental o estudo da

viabilidade da superovulação iniciada próximo a emergências de ondas folicular que ocorrem durante o período dos protocolos hormonais bases, tendo como destaque, possíveis melhorias na resposta superovulatória e produção de embriões.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Obter informações sobre resposta superovulatória e de produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a diferentes protocolos hormonais de superovulação, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro.

2.2 ESPECÍFICOS

- Acompanhar o perfil sérico de progesterona durante os tratamentos superovulatórios iniciados próximo às emergências da primeira e última ondas foliculares dos protocolos, nos períodos estacionais de ciclicidade, transição e anestro.

- Confrontar a viabilidade dos protocolos hormonais de superovulação quanto às respostas superovulatórias e de produção de embriões, nos diferentes períodos estacionais ;

- Examinar aspectos morfológicos relacionados à qualidade dos embriões produzidos pelos diferentes tratamentos e períodos estacionais;

- Avaliar protocolos hormonais de superovulação que atendam às peculiaridades fisiológicas estacionais em ovelhas da raça Santa Inês.

3. HIPÓTESE INICIAL

- A superovulação iniciada próximo à emergência da primeira onda folicular do protocolo hormonal garantirá respostas superovulatória e de produção de embriões equivalentes à superovulação iniciada próximo a emergência da última onda folicular do tratamento. Tal fato permitirá o desenvolvimento de protocolos de curta duração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

Os animais foram mantidos em piquete anexo ao Departamento de Reprodução Animal (DMVPRA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) - Campus de Jaboticabal (21° 15' 18" Sul e 48° 19' 19" Oeste), em sistema intensivo de criação, onde tiveram acesso a água, sal mineral e silagem de milho ad libitum. Ração balanceada foi fornecida na quantidade de 200g/animal/dia. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas em sala anexa ao DMVPRA. O sangue colhido foi processado e armazenado no DMVPRA para posterior dosagem de progesterona, realizadas no Laboratório de Radioimunoensaio, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp - Botucatu; CNEN matrícula 14.998). No laboratório de Produção *in vitro* de embriões do DMVPRA foram realizadas as avaliações referente aos embriões produzidos.

4.2 Animais

Foram selecionadas fêmeas sexualmente adultas, pluríparas, não prenhes, não lactantes e consideradas híginas após realização de exame clínico geral e ultrassonográfico do aparelho reprodutor.

Utilizou-se, nesse experimento, 60 ovelhas da raça Santa Inês (Anestro, n=20; Transição, n=20; e Ciclicidade, n=20). Os animais apresentavam, ao início do experimento, peso médio de 41,28±6,29, 43,47±6,29 e 40,87±4,77 Kg para os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente.

4.3 Grupos e Tratamentos

O presente estudo destinou-se à avaliação dos diferentes protocolos hormonais de superovulação para colheita de embriões definidos com base nos resultados obtidos no primeiro experimento (Capítulo II). Foram testados os protocolos determinados de acordo com as particularidades estacionais, anestro (inverno - entre os meses de julho e novembro de 2010); transição (verão - entre os meses de dezembro de 2010 a fevereiro de 2011) e ciclicidade (final do verão ao início do inverno - entre os meses de março a junho de 2011). As ovelhas de cada período estacional foram subdivididas aleatoriamente em dois grupos que receberam concomitantemente tratamentos superovulatórios distintos, iniciados na primeira e última ondas foliculares do protocolo (Tabela 1).

Os protocolos de superovulação consistiram na inserção de um dispositivo intravaginal contendo 0,3 g de progesterona⁹ no Dia 0 (dia aleatório do ciclo estral das fêmeas). Concomitantemente ao início do protocolo foi administrado 37,5 µg de um análogo da PGF2α (D- Cloprostenol¹⁰), por via intramuscular. A permanência do dispositivo, variou entre grupos e períodos estacionais. Para as ovelhas que receberam os protocolos iniciados próximo a emergência da primeira onda folicular (G-PrimeiraOnda), o dispositivo foi mantido por 6, 6 e 8 dias para os períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente. Aquelas submetidas os protocolos iniciados próximo a emergência da última onda folicular (G-ÚltimaOnda), o dispositivo foi mantido por 12, 12 e 13 dias, respectivamente. O G-ÚltimaOnda realizado durante o período de transição diferiu, ainda, pela substituição do dispositivo por um novo ao 7º dia do protocolo.

⁹ Eazi- Breed CIDR® - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia

¹⁰ Prolise®, Arca S.R.L., Argentina

Tabela 1 - Grupos experimentais preconizados para tratamentos de superovulação e colheita de embriões em ovelhas da raça Santa Inês.

GRUPOS	TRATAMENTOS	PERÍODO ESTACIONAL
G – Primeira onda	Protocolo Primeira Onda	Anestro (n=10)
		Transição (n=10)
		Acasalamento (n=10)
G – Última onda	Protocolo Última Onda	Anestro (n=10)
		Transição (n=10)
		Acasalamento (n=10)

n: número de animais por grupo.

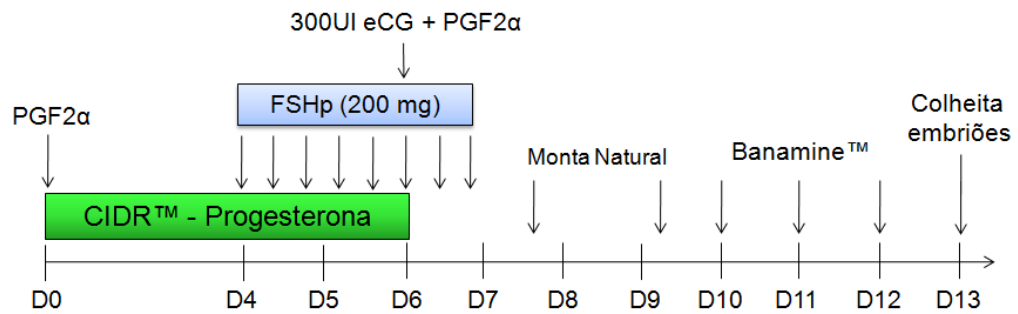
Independentemente do grupo e período estacional, o tratamento gonadotrófico destinado a superestimulação ovariana consistiu na administração de 200mg de FSHp¹¹ fracionadas em quatro doses decrescentes, sendo que cada dose foi repetida uma vez após 12 horas, totalizando 8 administrações (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 e 10 mg de FSHp). O início do tratamento superestimulatório ocorreu dois dias antes da remoção do dispositivo de progesterona (Dias 4, 4, e 6 e Dias 10, 10, e 11 para os grupos Primeira onda e Última onda, nos períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente). Todos os animais receberam, ainda, ao final do tratamento com progesterona (i.e. concomitantemente a sexta administração de FSHp) 200 UI de eCG¹² e 37,5 µg de D-Cloprostenol, intramuscularmente (Figura 1 e 2).

Para evitar a regressão prematura dos corpos lúteos, administrou-se em todas as fêmeas três doses de 75 mg de Flunixin meglumine a intervalo de 24 horas, iniciando quatro dias após a remoção do dispositivo de progesterona.

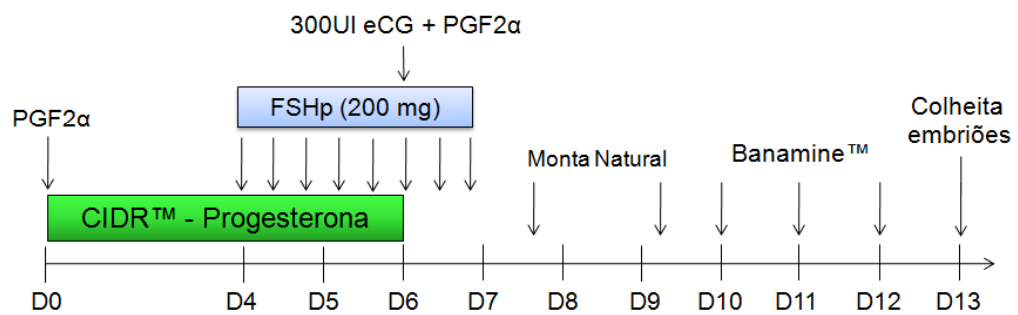
¹¹ Folltropin®, Bioniche, Canadá

¹² Novormon 5000™, Shering-Plough S. A., Syntex S.A., Argentina

Grupo Primeira Onda – Estação de Anestro



Grupo Primeira Onda – Estação de Transição



Grupo Primeira Onda – Estação de Ciclicidade

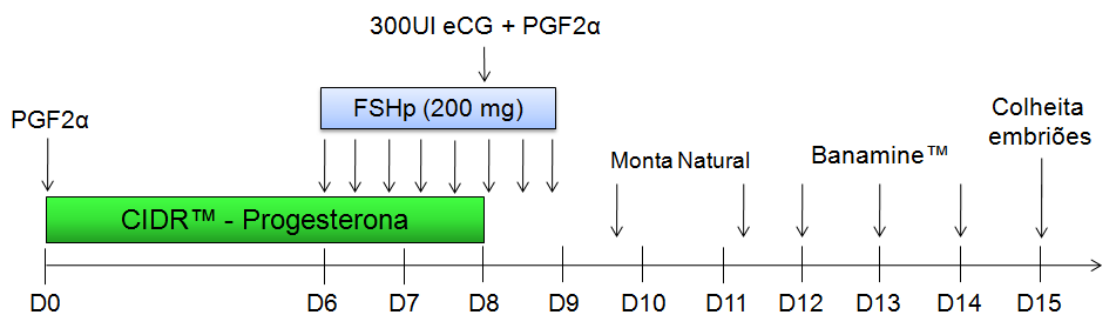
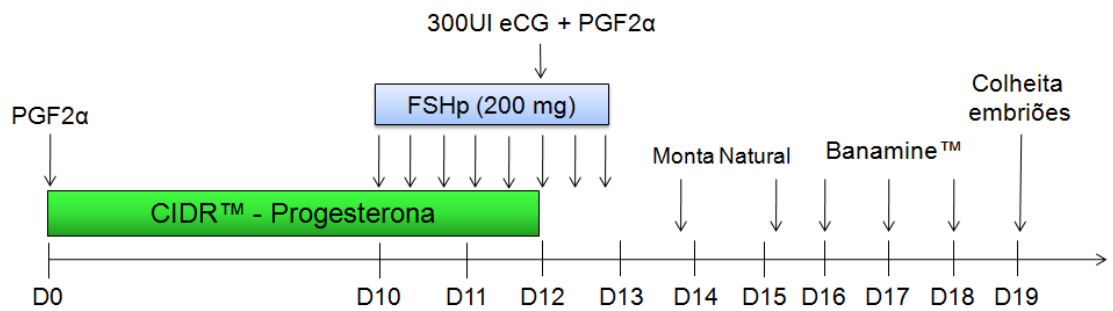
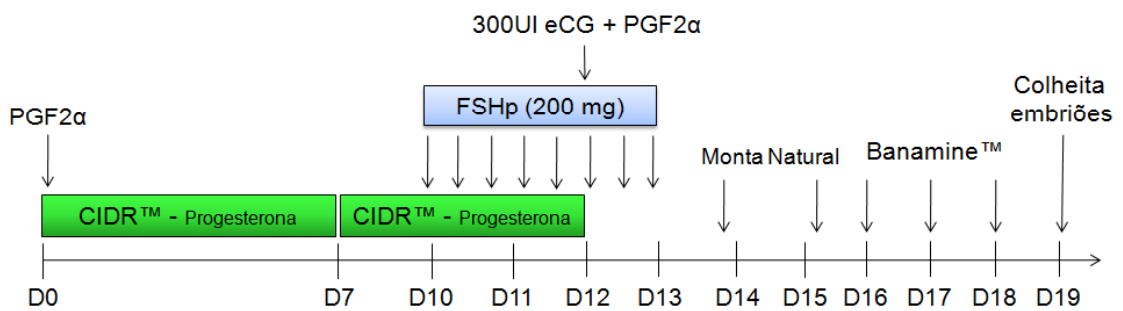


Figura 1 - Esquema dos tratamentos hormonais destinados à superovulação da primeira onda folicular do protocolo, de acordo com os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade.

Grupo Última Onda – Estação de Anestro



Grupo Última Onda – Estação de Transição



Grupo Última Onda – Estação de Ciclicidade

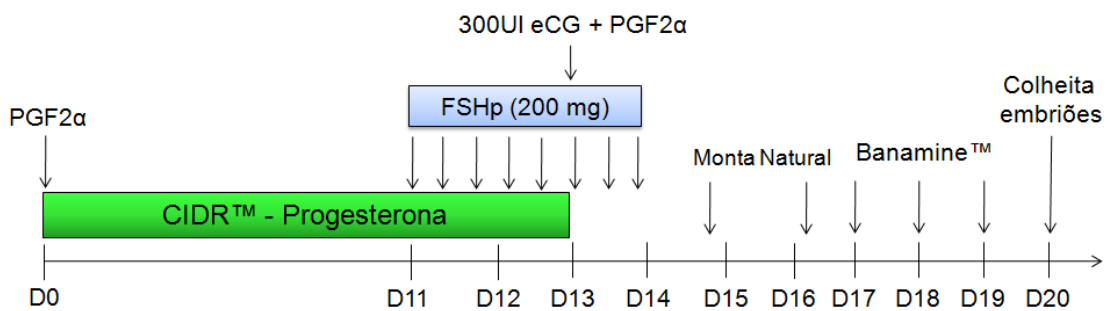


Figura 2 - Esquema dos tratamentos hormonais destinados à superovulação da última onda folicular do protocolo, de acordo com os períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade.

4.4 Avaliação ultrassonográfica

Durante a permanência do dispositivo de progesterona, as observações ultrassonográficas foram realizadas em dois momentos, ao início dos protocolos hormonais de superovulação (D0) e imediatamente antes à primeira administração de FSH, a fim de identificar a população folicular presente nos ovários. A população folicular ao início do tratamento superestimulatório com gonadotrofina exógena (FSH) foi classificada de acordo com o diâmetro folicular em categorias: (1) folículos com diâmetro entre 2 e 4,25 mm; representativo da população de folículos antes da fase dominância; (2) folículos com diâmetro entre 4,5 e 5 mm; fase "inicial" da dominância; (3) folículos com diâmetro entre 5,25 e 5,75 mm; fase "média" da dominância; (4) folículos com diâmetro igual ou superior a 6 mm. As duas últimas categorias compreendem os folículos descritos como prejudiciais para o adequado desenvolvimento dos folículos em emergência, segundo RUBIANES et al. (1995; 1997). Após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, foram realizados exames ultrassonográficos a intervalos de 8 horas durante 72 horas para avaliação das ovulações. A ovulação foi definida pela ausência do(s) folículo(s) dominante(s) detectados nos exames anteriores, e confirmada posteriormente pela detecção de corpo lúteo no dia da colheita de embriões.

Em síntese, as observações foram conduzidas com a fêmea em posição quadrupedal, tendo a parede abdominal comprimida, para facilitar a visualização do útero e ovários. Utilizou-se equipamento de ultrassom¹³, em modo-B tempo real, contendo transdutor linear multifrequencial (6 e 8 MHz). Um tubo de plástico ligeiramente curvado (comprimento 30 cm) foi fixado ao cabo do transdutor para permitir sua manipulação externamente. Após deposição do gel¹⁴ sobre o transdutor, este foi introduzido no reto com a superfície de contato posicionada perpendicularmente a parede abdominal. Quando a bexiga urinária foi ultrapassada e os cornos uterinos localizados, o transdutor foi lentamente

¹³ Ultra-som, Aquila, Pie Medical, Holanda

¹⁴ Gel à base de carboxi-metil-celulose, Gerbras, Latino Química Antex, Argentina

rotacionado para esquerda e direita a fim de se observar os ovários e suas estruturas. Todos os folículos $\geq 1,5$ mm e corpos lúteos detectados pela ultrassonografia foram quantificados e seus diâmetros mensurados, sendo então identificados de acordo com seu posicionamento, de modo a permitir o acompanhamento de suas transformações diárias. O diâmetro de cada estrutura foi calculado pela equação $(D=(A+B)/2)$; A - representa a máxima altura e B – o diâmetro transversal máximo.

4.5 Colheitas de sangue

Foram realizadas colheitas de sangue diariamente, pela manhã, durante todo o período dos protocolos hormonais de superovulação, a fim de determinar as concentrações séricas de progesterona. Nova colheita foi realizada no dia da lavagem uterina para recuperação dos embriões. As colheitas de sangue foram procedidas por punção da veia jugular, com as fêmeas em posição quadrupedal, utilizando-se tubo a vácuo de 10 mL, sem aditivos e identificado com o número do animal e data da colheita. Após a colheita, o sangue foi centrifugado a $3.000 \times g$ por 15 min. O soro sanguíneo obtido foi transferido para micro-tubos de polipropileno em duas alíquotas, de mesmo volume, devidamente identificados e mantidos a -20°C , para posterior realização das análises hormonais.

4.6 Dosagem hormonal

As amostras de soro congeladas foram destinadas à dosagem da progesterona, pela técnica de radioimunoensaio (RIA), seguindo-se as recomendações do fabricante do kit¹⁵ utilizado. O limite de detecção médio dos ensaios (sensibilidade) foi de $0,009 \pm 0,004$ ng/mL. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 0,99% e 0,99%, respectivamente.

¹⁵ COAT A- COUNT Progesterona, Diagnostic Products Corporation, Estados Unidos da América

4.7 Observações de estro e Monta natural

Ao final dos tratamentos com progesterona, a detecção de estro e a cobertura das fêmeas foram realizadas com auxílio de machos adultos reprodutores previamente testados quanto ao desempenho da libido e características seminais. Machos e fêmeas foram mantidos juntos durante os quatro dias seguintes a retirada do dispositivo de progesterona, na proporção de um macho para cinco fêmeas. Os machos tiveram a região peitoral manchada com graxa colorida. As identificações das fêmeas marcadas foram realizadas três vezes por dia, detectando assim o momento inicial do estro e a sincronia entre as fêmeas.

4.8 Colheita de embriões

Imediatamente antes do início do procedimento de colheita de embriões (seis dias após o início do estro), realizou-se a avaliação das estruturas ovarianas, por via videolaparoscópica. Os corpos lúteos visualizados foram quantificados. Os folículos com diâmetro superior a 5 mm também foram computados sendo nomeados de folículos anovulatórios.

Os dados obtidos foram utilizados para calcular os índices da resposta superovulatória em cada ovelha: taxa de ovulação, calculada pela divisão do número de corpos lúteos observados na colheita de embriões pelo somatório do número de corpos lúteo e folículos pré-ovulatórios observados na dinâmica folicular; número de folículos anovulatórios, calculado pela subtração do número de folículos pré-ovulatórios na dinâmica folicular, do número de corpos lúteos observados na colheita de embriões. A taxa de falhas anovulatórias foi obtida pela divisão, em cada ovelha, do número total de folículos anovulatórios pelo número de corpos lúteos mais os folículos anovulatórios.

A resposta superovulatória das ovelhas foi ainda classificada em três escores, segundo Oliveira (2008):

- Escore 0: Fêmeas que não responderam ao tratamento superovulatório, demonstrando 4 ou menos ovulações;

- Escore 1: Fêmeas que responderam com número de corpos lúteos entre 5 e 10;
- Escore 2: Resposta superovulatória alta, apresentando número de corpos lúteos igual ou superior a 11.

Definiu-se por colher embriões apenas das doadoras com resposta superovulatória classificada em escore 1 e 2. Os embriões foram colhidos cinco dias após o início das montas naturais, por lavagem uterina pela via cirúrgica.

As fêmeas foram previamente mantidas em jejum alimentar e hídrico de 24 horas, recebendo então, como medicação pré-anestésica 0,15 mg/Kg de cloridrato de xilazina a 2% e 0,07 mg/Kg de acepromazina, i.m. Em seguida, foi realizada anestesia epidural com 0,02 mg de lidocaína, sendo o animal posteriormente colocado em maca cirúrgica apropriada em posições de *Trendelenburg* e horizontal para os procedimentos de laparoscopia e colheita de embriões, respectivamente. No campo cirúrgico, região abdome caudal foi realizada a tricotomia e anti-sepsia com tintura de iodo, seguida pela colocação de panos de campo e realização de anestesia local infiltrativa na dose de 2 mL de cloridrato de lidocaína por botão anestésico, onde foram introduzidos os trocartes. Uma vez obtida a visão interna da cavidade, com auxílio de uma pinça Babcock, o útero, tubas e bursas ováricas foram manipulados para permitir a visualização dos ovários. Os mesmos foram apreendidos e reposicionados para realização da contagem de suas estruturas. Ato seguinte ao procedimento de videolaparoscopia, realizou-se a complementação da anestesia local infiltrativa na dose de 4 mL de cloridrato de lidocaína na linha média (ponto de punção de um dos trocartes, onde realizou-se a incisão de aproximadamente 8 cm. Após identificação, tracionamento cuidadoso e exposição dos cornos uterinos, realizou-se a lavagem uterina. Em síntese, para o procedimento de lavagem de cada corno uterino, introduziu-se a sonda "Foley" nº 10 na porção proximal, tendo o balão inflado para evitar refluxo de líquido. Na porção distal, próxima à junção útero-tubárica foi colocado um

cateter nº 20G por onde o meio PBS¹⁶ previamente aquecido a 37°C foi introduzido, permitindo a formação de um fluxo de líquido pelo corno até sua saída pela sonda “Foley”. Utilizou-se um volume total de 40 mL de meio PBS por corno lavado. O líquido recuperado foi armazenado em placas de Petri para posterior avaliação das estruturas recuperadas. O corno contra-lateral foi posteriormente lavado seguindo o mesmo procedimento. Durante todo o procedimento, o aparelho reprodutor exposto foi umedecido com solução fisiológica. Após a lavagem uterina, essa solução foi utilizada para remover possíveis coágulos formados, possibilitando minimizar a formação de aderências. Seguiu-se então, com a sutura das camadas muscular, subcutânea e dérmica.

4.9 Avaliação embrionária

Após as lavagens dos cornos uterinos, o líquido recuperado foi transportado para o laboratório de Produção *in vitro* de embriões, quando foi colocado em placas de Petri e avaliado sob aumento de 20 a 50X em estéreomicroscópio. As estruturas encontradas foram transferidas para gotas de meio de manutenção para imediata avaliação. A clivagem foi usada para evidenciar a fecundação dos oócitos. Assim, identificou-se o número de estruturas não fecundadas e os embriões encontrados foram então classificados quanto ao estágio de desenvolvimento. Os embriões em estágio de mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido foram ainda classificados quanto a qualidade, sendo considerados viáveis os de graus I a III (Tabela 2). Os embriões em estágio atrasado de desenvolvimento e/ou classificados em grau IV foram agrupados como estruturas degeneradas.

Posteriormente, foram calculados os índices para cada ovelha: taxa de recuperação, calculada pela divisão do número total de estruturas recuperadas pelo número de corpos lúteos; taxa de viabilidade, calculada pela divisão do número de embriões viáveis pelo número total de estruturas recuperadas; taxa de não-fecundados, calculada pela divisão do número de oócitos dividido pelo

¹⁶ Dulbecco Modificado (DPBS), Embriocare, Cultilab, Brasil

número total de estruturas recuperadas; taxa de degenerados, calculada pela divisão do número de estruturas degeneradas dividido pelo número total de estruturas recuperadas.

Tabela 2 - Classificação dos embriões quanto à qualidade.

Grau	Classificação	Aspecto
I	Excelente	Embrião simétrico e esférico, com zona pelúcida íntegra, simétrico e com células de tamanho, coloração e textura uniformes.
II	Bom	Apresenta pequenas imperfeições como poucos blastômeros extrusos, formato irregular, alteração de cor ou presença de poucas vesículas.
III	Regular	Há maior número de imperfeições, como alguns blastômeros extrusos, vesiculações e algumas células degeneradas.
IV	Degenerado	Existem severas alterações como numerosos blastômeros extrusos, degenerados e de tamanho variados; grande número de vesículas e alguma massa embrionária viável.

IETS (1998), adaptados por OLIVEIRA (2008).

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software SAS versão 9.2 (2002-2008). Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o Guide Data Analise do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformados em conformidade. As variáveis de distribuição binomial, contínuas ou discretas foram analisados por ANOVA, usando o procedimento GLIMMIX do SAS. As variáveis consideradas para inclusão no modelo foram: grupo; período estacional; interação grupo e período estacional; *status* D0; concentração de progesterona concomitantemente ao início e término do tratamento e, ainda no dia da colheita de embriões; e número de folículos da categoria 1 (2 - 4,25 mm de

diâmetro) . No modelo de regressão final foram removidas variáveis, baseado no critério estatístico de *Wald* quando $P > 0,20$. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$. Definiu-se por tendência quando o valor de P foi $\geq 0,05$ e $\leq 0,10$. Foram consideradas as comparações entre grupos dentro de cada período estacional e entre períodos estacionais dentro de grupo.

Os dados de progesterona foram analisados de forma pontual devido as diferenças dos protocolos de cada grupo entre os períodos estacionais. Selecionou-se os dias de início e término do tratamento superestimulatório com FSH e o dia da colheita de embriões para cada grupo e período estacional.

A análise estatística dos dados complementou-se pela execução do teste de Qui-quadrado para a frequência das variáveis relacionadas a classificação da resposta superovulatória e pela realização da correlação de Pearson entre as variáveis número de folículos com diâmetros entre 2 e 4,25 mm e número de corpos lúteos ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Progesterona

Os perfis séricos da progesterona nos dias de observações estão apresentados para os grupos tratados com os protocolos de superovulação iniciados próximo à emergência da primeira (Figura 3) e última (Figura 4) ondas foliculares de acordo com os períodos estacionais.

Conforme previsto na análise dos dados, os resultados para os dias de início e término do tratamento superestimulatório com FSH e o dia da colheita de embriões estão exibidos dentro de cada período estacional (Tabela 3) e grupo (Tabela 4). Concentração média de progesterona concomitantemente a primeira administração do FSH foi superior para o G - PrimeiraOnda em relação ao G - ÚltimaOnda no período de anestro ($P < 0,05$). Valor também superior foi observado para o G-PrimeiraOnda no momento final do tratamento com FSH no período de transição ($P < 0,05$). A variação verificada ao início do tratamento com FSH

certamente pode estar associada à diferença entre os grupos no dia do protocolo para esta intervenção (G - PrimeiraOnda: D4; e G - ÚltimaOnda: D10; D0 = inserção do dispositivo intravaginal de progesterona). A ausência de disparidade para esta variável entre grupos para o período de transição está relacionada a troca do dispositivo CIDR promovida no G-ÚltimaOnda no Dia 7 do protocolo hormonal. No período de ciclicidade, o tratamento com FSH foi iniciado mais tarde no G-PrimeiraOnda, não demonstrando desigualdade para a concentração de progesterona com o G-ÚltimaOnda.

Na análise do efeito do período estacional dentro de cada grupo (Tabela 4), verifica-se que para o G-PrimeiraOnda a concentração de progesterona ao início do tratamento com FSH foi maior no período de transição em relação ao anestro e ciclicidade ($P < 0,05$). Para o G-ÚltimaOnda, a superioridade observada no período de transição pode ser justificada pelas alterações no protocolo entre os períodos estacionais, quando considera-se o intervalo entre a inserção do novo dispositivo de progesterona e o momento de início do tratamento com a gonadotrofina exógena (FSH).

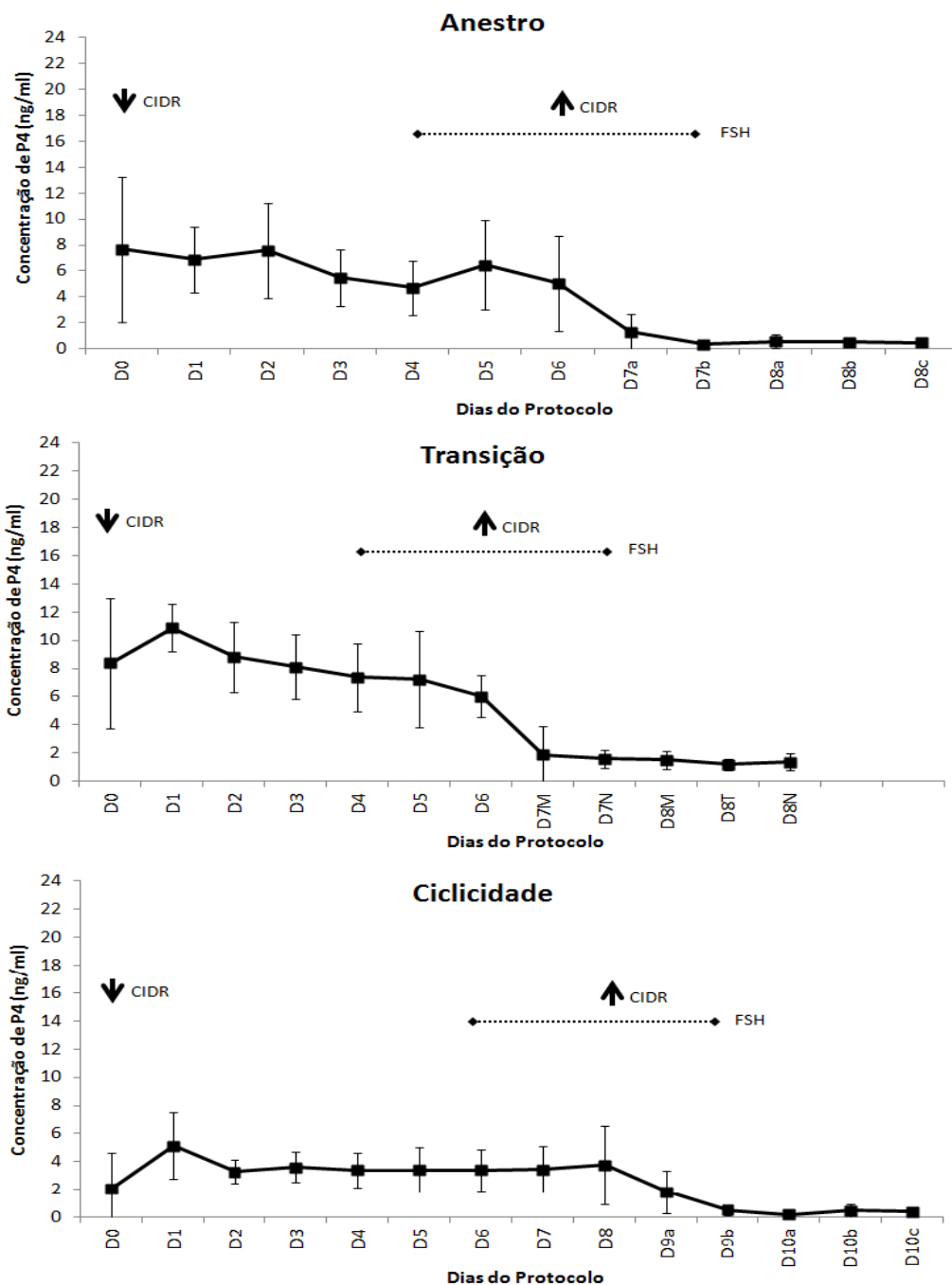


Figura 3 – Perfil sérico de Progesterona (P4) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular nos períodos de anestro, transição e ciclicidade; indicação esquemática dos principais eventos do protocolo.

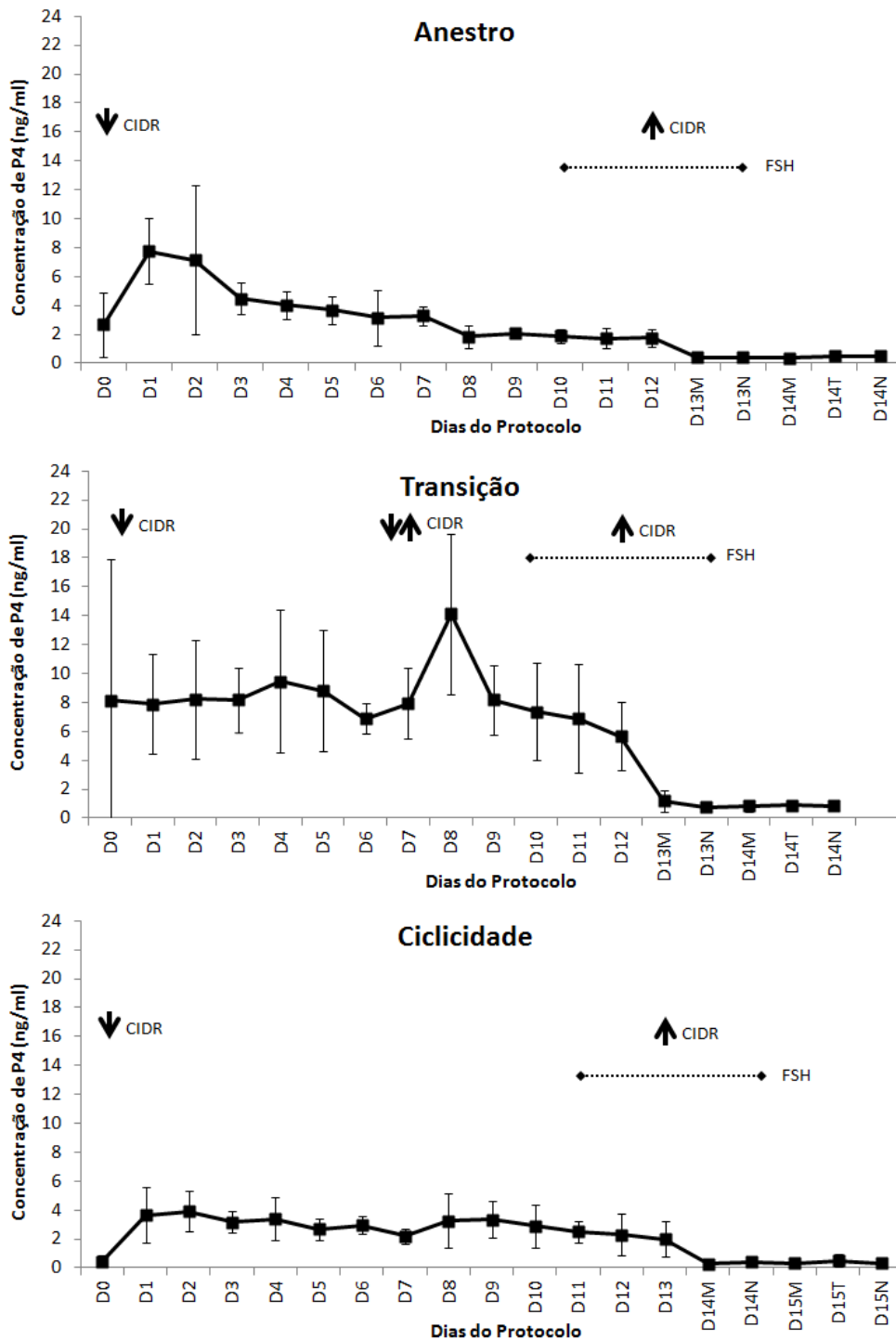


Figura 4 – Perfil sérico de Progesterona (P4) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da última onda folicular nos períodos estacionais de anestro, transição e ciclicidade; indicação esquemática dos principais eventos do protocolo.

Tabela 3 – Valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis relacionadas a concentração sérica de progesterona (P4) nos dias de início (1° FSH) e término (8° FSH) do tratamento superestimulatório com FSH e no momento da colheita de embriões de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) nos períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.

Estação	Grupo	P4 no 1° FSH	P4 no 8° FSH	P4 na TE
Anestro	G - Primeira Onda	4,62 \pm 0,64 ^a	0,53 \pm 0,18 ^a	19,09 \pm 2,96 ^a
	G - Última Onda	1,88 \pm 1,16 ^b	0,39 \pm 0,05 ^a	19,14 \pm 2,89 ^a
Transição	G - Primeira Onda	7,21 \pm 0,78 ^a	1,60 \pm 0,21 ^a	28,39 \pm 1,81 ^a
	G - Última Onda	7,32 \pm 1,14 ^a	0,77 \pm 0,05 ^b	28,44 \pm 2,16 ^a
Ciclicidade	G - Primeira Onda	3,41 \pm 0,46 ^a	0,51 \pm 0,11 ^a	19,08 \pm 3,10 ^a
	G - Última Onda	2,40 \pm 0,24 ^a	0,38 \pm 0,08 ^a	12,65 \pm 3,06 ^a

^{ab}Letras diferem entre grupos na mesma estação (P<0,05).

Tabela 4 – Valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis relacionadas a concentração sérica de progesterona (P4) nos dias de início e término do tratamento superestimulatório com FSH e momento da colheita de embriões de acordo com os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade) nos grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares), em ovelhas da raça Santa Inês.

Grupo	Estação	P4 na 1° FSH	P4 na 8° FSH	P4 na TE
G - Primeira Onda	Anestro	4,62 \pm 0,64 ^b	0,53 \pm 0,18 ^b	19,09 \pm 2,96 ^b
	Transição	7,21 \pm 0,78 ^a	1,60 \pm 0,21 ^a	28,39 \pm 1,81 ^a
	Ciclicidade	3,41 \pm 0,46 ^b	0,51 \pm 0,11 ^b	19,08 \pm 3,10 ^b
G - Última Onda	Anestro	1,88 \pm 1,16 ^c	0,39 \pm 0,05 ^a	19,14 \pm 2,89 ^b
	Transição	7,32 \pm 1,14 ^a	0,77 \pm 0,05 ^a	28,44 \pm 2,16 ^a
	Ciclicidade	2,40 \pm 0,24 ^b	0,38 \pm 0,08 ^a	12,65 \pm 3,06 ^b

^{ab}Letras diferem entre estações no mesmo grupo (P<0,05).

A concentração de progesterona no momento da colheita de embriões é um excelente indicativo da resposta superovulatória. Há vantagem desta técnica diagnóstica em relação a avaliação ultrassonográfica. Quando realiza-se essa última técnica em fêmeas com grande número de ovulação, não há garantia de alta acurácia na determinação do número de estruturas lúteas, bem como, as mensurações de seus diâmetros. No presente estudo, as avaliações realizadas por ultrassom antes de iniciar as colheitas de embriões foram imprecisas ao comparar com as respostas observadas pela videolaparoscopia, devido a dificuldade de delimitação e individualização de cada estrutura lútea pela ultrassonografia.

Na comparação da concentração de progesterona no momento da colheita de embriões não se fez notar nenhuma diferença entre os grupos em nenhum dos períodos estacionais ($P > 0,05$; Tabela 3). Entretanto, quando se considerou o efeito do período estacional dentro de cada grupo, observou valores superiores para os dois grupos realizados durante o período estacional da transição (Tabela 4). A mesma diferença não foi registrada para o número de corpos lúteos e taxa ovulatória (Tabelas 14, 15 e 16).

5.2 População Folicular

Há relatos de que o número de folículos pequenos (2-3 mm de diâmetro) presentes nos ovários ao início do tratamento gonadotrófico é representativo da população folicular responsiva ao FSH exógeno e capaz de crescer até diâmetro ovulatório. Correlação positiva entre o número destes folículos pequenos e a taxa ovulatória, assim como, produção de embriões viáveis foi relatada por GONZÁLES-BULNES et al. (2002) e COGNIÉ et al. (2003). No entanto, no presente estudo, não houve correlação entre estas variáveis ($P > 0,05$). Segundo BARTLEWSKI et al. (2008), o número de folículos dessa categoria ao início do tratamento superestimulatório não foi correlacionado com a resposta superovulatória, entretanto, o número de folículos com diâmetro médio de 4 mm, 12 horas após a primeira administração de FSH, foi positivamente correlacionado

com o número de estruturas lúteas e embriões viáveis. Com base nesses resultados, acredita-se que apenas alguns dos folículos antrais desenvolvem-se e ovulam em resposta ao tratamento com FSH exógeno (SCARAMUZZI et al., 1993). Ademais, vale complementar que em 36,66% (22/60) das ovelhas do presente experimento observou-se número de corpos lúteos superior ao número de folículos pequenos, sugerindo a estimulação de folículos ainda imperceptíveis ao exame ultrassonográfico no dia da primeira administração de FSH, ou ainda, ovulação de folículos provenientes de outras ondas foliculares, assim, com emergência em momentos distintos.

O número de folículos da categoria 1 (2 - 4,25 mm) foi superior para o G-ÚltimaOnda em relação ao G-PrimeiraOnda nos períodos de anestro e ciclicidade ($P < 0,05$; Tabelas 5 e 7). Valores similares foram encontrados para o período de transição ($P > 0,05$; Tabela 6).

Tabela 5 – Valores médios (\pm S.E.M.) e ocorrência nos animais para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) no período de anestro, em ovelhas da raça Santa Inês.

Variáveis	G - Primeira Onda		G - Última Onda	
	Média	Ocorrência	Média	Ocorrência
N° Fol. categoria 1 (2 - 4,25 mm)	12,9 \pm 0,92 ^b	100% (10/10)	15,90 \pm 0,98 ^a	100% (10/10)
Diâmetro Folículos categoria 1	3,00 \pm 0,05 ^a	.	2,84 \pm 0,07 ^a	.
N° Fol. categoria 2 (4,5 - 5 mm)	1,80 \pm 0,55 ^a	70% (7/10)	0,70 \pm 0,26 ^b	60% (6/10)
Diâmetro Folículos categoria 2	4,79 \pm 0,06 ^a	.	4,81 \pm 0,08 ^a	.
N° Fol. categoria 3 (5,25 - 5,75 mm)	0,30 \pm 0,15 ^a	30% (3/10)	0,70 \pm 0,21 ^a	60% (6/10)
Diâmetro Folículos categoria 3	5,53 \pm 0,09 ^a	.	5,49 \pm 0,09 ^a	.
N° Fol. categoria 4 (\geq 6 mm)	0,20 \pm 0,13 ^a	20% (2/10)	0,40 \pm 0,16 ^a	40% (4/10)
Diâmetro Folículos categoria 4	6,00 \pm 0,00 ^a	.	6,52 \pm 0,20 ^a	.

^{ab}Letras diferem entre grupos ($P < 0,05$).

Tabela 6 – Valores médios (\pm S.E.M.) e ocorrência nos animais para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) no período de transição, em ovelhas da raça Santa Inês.

Variáveis	G - Primeira Onda		G - Última Onda	
	Média	Ocorrência	Média	Ocorrência
N° Fol. categoria 1 (2 - 4,25 mm)	12,8 \pm 0,84 ^a	100% (10/10)	14,40 \pm 1,24 ^a	100% (10/10)
Diâmetro Folículos categoria 1	2,97 \pm 0,11 ^a	.	2,83 \pm 0,03 ^a	.
N° Fol. categoria 2 (4,5 - 5 mm)	1,70 \pm 0,39 ^a	90% (9/10)	1,10 \pm 0,27 ^a	80% (8/10)
Diâmetro Folículos categoria 2	4,74 \pm 0,07 ^a	.	4,82 \pm 0,07 ^a	.
N° Fol. categoria 3 (5,25 - 5,75 mm)	0,60 \pm 0,22 ^a	50% (5/10)	0,60 \pm 0,22 ^a	50% (5/10)
Diâmetro Folículos categoria 3	5,43 \pm 0,09 ^a	.	5,32 \pm 0,05 ^a	.
N° Fol. categoria 4 (\geq 6 mm)	0,00 \pm 0,00 ^a	0% (0/10)	0,00 \pm 0,00 ^a	0% (0/10)
Diâmetro Folículos categoria 4

^{ab}Letras diferem entre grupos ($P < 0,05$).

Nenhum efeito foi observado para a variável entre períodos estacionais em um mesmo grupo ($P > 0,05$; Tabelas 8 e 9). A ausência de correlação entre o número de folículos pequenos (categoria 1) ao início do tratamento com FSH e o número de corpos lúteos pode ser confirmada pela discrepância de variação verificada para a última variável, quando houve maior número de ovulações apenas para o G-PrimeiraOnda no período de transição (Tabela 15).

A presença de folículos nas categorias de diâmetros maiores demonstra que embora a superestimulação gonadotrófica tenha iniciado próximo a emergências de ondas foliculares não garantiu a ausência de folículos potencialmente prejudiciais ao adequado desenvolvimento daqueles que iniciam seu crescimento antral, conforme RUBIANES et al. (1995; 1997). Os mesmos

resultados foram encontrados quando avaliou-se a dinâmica folicular dos protocolos base para a superovulação, no Experimento 1 do presente estudo. A ausência de folículos com diâmetro igual ou superior a 6 mm no período de transição, independentemente do protocolo de superovulação (G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda), igualam-se mais uma vez aos resultados do Experimento 1.

Tabela 7 – Valores médios (\pm S.E.M.) e ocorrência nos animais para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com os grupos (protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares) no período de ciclicidade, em ovelhas da raça Santa Inês.

Variáveis	G - Primeira Onda		G - Última Onda	
	Média	Ocorrência	Média	Ocorrência
N° Fol. categoria 1 (2 - 4,25 mm)	12,10 \pm 0,50 ^b	100% (10/10)	15,50 \pm 1,01 ^a	100% (10/10)
Diâmetro Folículos categoria 1	3,11 \pm 0,09 ^a	.	2,80 \pm 0,06 ^b	.
N° Fol. categoria 2 (4,5 - 5 mm)	1,70 \pm 0,39 ^a	90% (9/10)	1,60 \pm 0,26 ^b	40% (4/10)
Diâmetro Folículos categoria 2	4,67 \pm 0,06 ^a	.	4,76 \pm 0,03 ^a	.
N° Fol. categoria 3 (5,25 - 5,75 mm)	0,10 \pm 0,10 ^b	10% (1/10)	0,70 \pm 0,21 ^a	60% (6/10)
Diâmetro Folículos categoria 3	5,80 \pm 0,00 ^a	.	5,39 \pm 0,05 ^a	.
N° Fol. categoria 4 (\geq 6 mm)	0,60 \pm 0,22 ^a	50% (5/10)	0,20 \pm 0,13 ^b	20% (2/10)
Diâmetro Folículos categoria 4	6,36 \pm 0,18 ^a	.	6,32 \pm 0,32 ^a	.

^{ab}Letras diferem entre grupos (P<0,05).

Tabela 8 – Valores médios (\pm S.E.M.) para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular entre os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.

Variáveis	G - Primeira Onda		
	Anestro	Transição	Ciclicidade
N° Fol. categoria 1 (2 - 4,25 mm)	12,9 \pm 0,92 ^a	12,8 \pm 0,84 ^a	12,10 \pm 0,50 ^a
Diâmetro Folículos categoria 1	3,00 \pm 0,05 ^a	2,97 \pm 0,11 ^a	3,11 \pm 0,09 ^a
N° Fol. categoria 2 (4,5 - 5 mm)	1,80 \pm 0,55 ^a	1,70 \pm 0,39 ^a	1,70 \pm 0,39 ^a
Diâmetro Folículos categoria 2	4,79 \pm 0,06 ^a	4,74 \pm 0,07 ^a	4,67 \pm 0,06 ^a
N° Fol. categoria 3 (5,25 - 5,75 mm)	0,30 \pm 0,15 ^a	0,60 \pm 0,22 ^a	0,10 \pm 0,10 ^a
Diâmetro Folículos categoria 3	5,53 \pm 0,09 ^a	5,43 \pm 0,09 ^a	5,80 \pm 0,00 ^a
N° Fol. categoria 4 (\geq 6 mm)	0,20 \pm 0,13 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,60 \pm 0,22 ^a
Diâmetro Folículos categoria 4	6,00 \pm 0,00 ^a	.	6,36 \pm 0,18 ^a

^{ab}Letras diferem entre estações (P<0,05).

Tabela 9 – Valores médios (\pm S.E.M.) para as variáveis relacionadas à população folicular ao início do tratamento superestimulatório com FSH iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular entre os períodos (anestro, transição e ciclicidade), em ovelhas da raça Santa Inês.

Variáveis	G - Última Onda		
	Anestro	Transição	Ciclicidade
N° Fol, categoria 1 (2 - 4,25 mm)	15,90 \pm 0,98 ^a	15,50 \pm 1,01 ^a	12,10 \pm 0,50 ^a
Diâmetro Folículos categoria 1	2,84 \pm 0,07 ^a	2,80 \pm 0,06 ^a	3,11 \pm 0,09 ^a
N° Fol. categoria 2 (4,5 - 5 mm)	0,70 \pm 0,26 ^a	1,60 \pm 0,26 ^a	1,70 \pm 0,39 ^a
Diâmetro Folículos categoria 2	4,81 \pm 0,08 ^a	4,76 \pm 0,03 ^a	4,67 \pm 0,06 ^a
N° Fol. categoria 3 (5,25 - 5,75 mm)	0,70 \pm 0,21 ^a	0,70 \pm 0,21 ^a	0,10 \pm 0,10 ^a
Diâmetro Folículos categoria 3	5,49 \pm 0,09 ^a	5,39 \pm 0,05 ^a	5,80 \pm 0,00 ^a
N° Fol. categoria 4 (\geq 6 mm)	0,40 \pm 0,16 ^a	0,20 \pm 0,13 ^b	0,60 \pm 0,22 ^{ab}
Diâmetro Folículos categoria 4	6,52 \pm 0,20 ^a	6,32 \pm 0,32 ^a	6,36 \pm 0,18 ^a

^{ab}Letras diferem entre estações (P<0,05).

5.3 Manifestações de estro

Todas as ovelhas manifestaram estro ao final dos protocolos de superovulação independentemente dos períodos estacionais. O intervalo entre o final dos tratamentos com progesterona (retirada do dispositivo – CIDR) e início do estro não diferiu entre os grupos ($P>0,05$), entretanto, sob efeito do período, verificou-se maior intervalo para o período de anestro ($P<0,05$, Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios (\pm S.E.M.) para o intervalo entre o final dos protocolos de superovulação (retirada do dispositivo – CIDR) e o momento do início do estro de acordo com os grupos e períodos estacionais, em ovelhas da raça Santa Inês.

Início do estro (hora após remoção do CIDR)	Anestro	Transição	Ciclicidade
G - Primeira Onda	27,60 \pm 2,56 ^a	19,80 \pm 1,56 ^b	20,40 \pm 0,98 ^b
G - Última Onda	26,40 \pm 2,40 ^a	19,80 \pm 1,28 ^b	19,80 \pm 0,91 ^b

^{ab}Letras diferem entre si na mesma linha (dentro de grupo, entre períodos estacionais; $P<0,05$);

* $P>0,05$ entre grupos dentro de períodos estacionais.

5.4 Resposta superovulatória e produção de embriões

A resposta superovulatória das ovelhas, criteriosamente avaliada pela contagem dos corpos lúteos no dia da colheita de embriões foi classificada em três escores, quando se revelou variação percentual entre grupos, de acordo com os períodos estacionais [anestro (Tabela 11), transição (Tabela 12) e ciclicidade (Tabela 13)].

Foram considerados animais que responderam ao tratamento superovulatório aqueles com número de corpos lúteos igual ou superior a cinco, isto é, somatório do escore 1 e 2. Baseado neste conceito, a frequência de fêmeas que responderam ao tratamento foi de 100% para as ovelhas submetidas ao protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda

folicular, independentemente do período estacional. Já para o G-ÚltimaOnda, observou-se percentual de 90%, 100% e 80% para os períodos de anestro, transição e ciclicidade, respectivamente. A discrepância não foi confirmada estatisticamente, possivelmente devido ao número de programas realizados em cada grupo. Pôde-se notar que a maioria das ovelhas responderam a superovulação com número igual ou superior a 11 corpos lúteos, independentemente dos grupos e períodos estacionais.

Tabela 11 - Distribuição da frequência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média \pm desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) por categoria, em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de anestro.

Grupos	Resposta superovulatória											
	Escore 0				Escore 1				Escore 2			
	%	Média CL	Mín	Máx	%	Média CL	Mín	Máx	%	Média CL	Mín	Máx
G-primeira onda	0	-			30	9,33 \pm 0,58	9	10	70	13,71 \pm 2,63	11	16
G-última onda	10	4,00 \pm 0,00	0	4	30	8,67 \pm 1,53	7	10	60	16,00 \pm 4,94	13	26

Escore 0: \leq 4 corpos lúteos; Escore 1: 5 - 10 corpos lúteos; Escore 2: \geq 11 corpos

Tabela 12 - Distribuição da frequência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média \pm desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) por categoria, em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de transição.

Grupos	Resposta superovulatória											
	Escore 0				Escore 1				Escore 2			
	%	Média CL	Mín	Máx	%	Média CL	Mín	Máx	%	Média CL	Mín	Máx
G-primeira onda	0	-			50	7,2 \pm 1,64	6	9	50	19,0 \pm 5,56	14	26
G-última onda	0	-			30	7,66 \pm 0,57	7	8	70	16,71 \pm 4,75	12	25

Escore 0: \leq 4 corpos lúteos; Escore 1: 5 - 10 corpos lúteos; Escore 2: \geq 11 corpos

Pelos resultados pode-se apontar que todos os protocolos utilizados foram eficientes para garantir uma resposta superovulatória satisfatória, entretanto, com variação individual dentro dos grupos. É reportado em ovelhas da mesma raça submetidas a protocolo hormonal tradicional eficiência referente ao percentual de animais que respondem ao tratamento superovulatório (≥ 5 corpos lúteos) de 100% (OLIVEIRA et al., 2009). Possivelmente, devido a alta variabilidade individual, respostas inferiores foram registradas por CORDEIRO et al. (2003; 73-60%), utilizando a mesma raça e protocolo.

Tabela 13 - Distribuição da frequência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média \pm desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) por categoria, em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de ciclicidade.

Grupos	Resposta superovulatória											
	Escore 0				Escore 1				Escore 2			
	%	Média CL	Mín	Máx	%	Média CL	Mín	Máx	%	Média CL	Mín	Máx
G-primeira onda	0	-			0	-			100	17,00 \pm 7,30	11	34
G-última onda	20	1,50 \pm 2,12	0	3	20	8,50 \pm 0,70	8	9	60	17,50 \pm 6,12	11	29

Escore 0: ≤ 4 corpos lúteos; Escore 1: 5 - 10 corpos lúteos; Escore 2: ≥ 11 corpos

Os índices da resposta superovulatória e produção de embriões estão exibidos de acordo com os grupos (G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda), nos períodos estacionais de anestro (Tabela 14), transição (Tabela 15) e ciclicidade (Tabela 16). O efeito do período estacional pode ser visualizado de acordo com os grupos, G-PrimeiraOnda (Tabela 17) e G-ÚltimaOnda (Tabela 18).

A resposta superovulatória, referente a variável taxa de ovulação, diferiu entre tratamentos apenas para aqueles conduzidos durante o período de ciclicidade ($P < 0,05$; Tabela 16), quando registrou maior percentual médio para o grupo de ovelhas que receberam o protocolo superovulatório iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular ($97,90 \pm 1,45$ versus $88,55 \pm 4,45$, $P < 0,05$).

O mesmo comportamento foi constatado para a variável número de ovulações ($17,00 \pm 2,31$ versus $12,50 \pm 2,62$ para G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda no período de ciclicidade, respectivamente).

As variáveis, número de ovulações e taxa ovulatória, revelaram apenas tendência entre os períodos de anestro e ciclicidade para G-PrimeiraOnda ($P=0,08$).

Tabela 14 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de anestro.

Variáveis	G - Primeira Onda			G - Última Onda			P
	Média	Valores		Média	Valores		
		Mín	Máx		Mín	Máx	
Número de programas	10			10			
Ovelhas superovuladas (%)	100			90			
Nº de ovulações	$12,40 \pm 0,95$	9	17	$12,60 \pm 1,87$	4	26	0,63
Taxa de ovulação (%)	$89,20 \pm 4,15$	61	100	$83,50 \pm 6,17$	35	100	0,13
Nº de Folículos Anovulatórios	$1,70 \pm 0,70$	0	7	$3,10 \pm 1,59$	0	17	0,12
Nº de estruturas recuperadas	$8,60 \pm 1,01$	6	15	$5,90 \pm 0,90$	2	12	0,70
Taxa de recuperação (%)	$69,90 \pm 5,61$	47	100	$51,70 \pm 7,50$	22	86	0,22
Nº de embriões viáveis	$3,20 \pm 0,81$	0	7	$1,80 \pm 0,80$	0	8	0,84
Taxa de viabilidade (%)	$40,50 \pm 11,93$	0	100	$32,70 \pm 11,74$	0	100	0,79
Nº de estruturas não fecundadas	$2,90 \pm 1,29$	0	11	$2,80 \pm 1,27$	0	12	0,68
Taxa de não fecundação (%)	$27,20 \pm 10,23$	0	79	$38,80 \pm 11,93$	0	100	0,20
Nº de embriões degenerados	$2,30 \pm 0,98$	0	8	$0,80 \pm 0,51$	0	5	0,05
Taxa de degeneração (%)	$28,80 \pm 11,87$	0	100	$17,90 \pm 10,61$	0	100	0,17

O número de folículos anovulatórios não sofreu efeito do protocolo superovulatório para nenhum dos períodos estacionais ($P>0,05$; Tabelas 14, 15 e 16). Sob efeito de análise do período estacional, verificou-se no G-ÚltimaOnda maior número para o período de anestro em relação ao transição ($3,10 \pm 1,59$

versus $0,90 \pm 0,31$, $P < 0,05$; Tabela 18). Entre os períodos de transição e ciclicidade indicou-se apenas tendência ($0,90 \pm 0,31$ *versus* $1,20 \pm 0,39$; $P = 0,08$).

Tabela 15 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de transição.

Variáveis	G - Primeira Onda			G - Última Onda			P
	Média	Valores		Média	Valores		
		Mín	Máx		Mín	Máx	
Número de programas	10			10			
Ovelhas superovuladas (%)	100			100			
Nº de ovulações	$13,10 \pm 2,31$	6	26	$14,00 \pm 1,85$	7	25	0,99
Taxa de ovulação (%)	$90,80 \pm 3,19$	67	100	$93,10 \pm 2,25$	80	100	0,85
Nº de Folículos Anovulatórios	$1,40 \pm 0,40$	0	3	$0,90 \pm 0,31$	0	3	0,80
Nº de estruturas recuperadas	$7,00 \pm 1,75$	1	20	$9,10 \pm 1,21$	2	14	0,25
Taxa de recuperação (%)	$55,10 \pm 8,56$	11	83	$67,00 \pm 6,14$	25	100	0,10
Nº de embriões viáveis	$3,90 \pm 1,94$	0	20	$5,70 \pm 1,40$	0	13	0,94
Taxa de viabilidade (%)	$49,10 \pm 13,83$	0	100	$58,70 \pm 10,95$	0	100	0,91
Nº de estruturas não fecundadas	$1,70 \pm 0,83$	0	8	$1,60 \pm 0,87$	0	7	0,84
Taxa de não fecundação (%)	$25,40 \pm 9,96$	0	89	$19,60 \pm 10,94$	0	100	0,92
Nº de embriões degenerados	$1,10 \pm 0,41$	0	4	$1,30 \pm 0,37$	0	3	0,79
Taxa de degeneração (%)	$20,90 \pm 7,05$	0	50	$17,30 \pm 5,13$	0	50	0,91

Acredita-se que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório interfere na resposta ao tratamento. A superestimulação com FSH iniciada na ausência de um folículo dominante tem resultado em melhores taxas de recrutamento folicular, ovulação e produção de embriões (RUBIANES et al., 1995; 1997; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002). No presente estudo, os tratamentos com a gonadotrofina iniciaram próximo a emergência de ondas foliculares, entretanto, não garantiu em todos os animais, ausência de folículos

dominantes (Tabelas 5, 6 e 7). Apesar do fato, as respostas marcadas pelo número de corpos lúteos, no presente estudo, registram valores superiores ao reportado em protocolo tradicional em que o tratamento com FSH inicia-se independentemente ao dia da emergência de onda (OLIVEIRA, 2008; média de $10,5 \pm 3,8$, mínimo 5 e máximo 15).

Tabela 16 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de ciclicidade.

Variáveis	G - Primeira Onda			G - Última Onda			P
	Média	Valores		Média	Valores		
		Mín	Máx		Mín	Máx	
Número de programas	10			10			
Ovelhas superovuladas (%)	80			100			
Nº de ovulações	$17,00 \pm 2,31$	11	34	$12,50 \pm 2,62$	0	29	0,03
Taxa de ovulação (%)	$97,90 \pm 1,45$	87	100	$88,55 \pm 4,45$	60	100	0,04
Nº de Folículos Anovulatórios	$0,70 \pm 0,57$	0	5	$1,20 \pm 0,39$	0	3	0,40
Nº de estruturas recuperadas	$9,00 \pm 1,38$	4	19	$6,33 \pm 1,12$	1	11	0,33
Taxa de recuperação (%)	$54,90 \pm 5,73$	17	79	$49,30 \pm 8,52$	17	100	0,68
Nº de embriões viáveis	$3,80 \pm 1,51$	0	16	$3,44 \pm 0,85$	0	8	0,82
Taxa de viabilidade (%)	$40,30 \pm 10,83$	0	84	$53,44 \pm 12,06$	0	100	0,63
Nº de estruturas não fecundadas	$3,20 \pm 1,33$	0	12	$1,78 \pm 0,86$	0	8	0,94
Taxa de não fecundação (%)	$37,10 \pm 13,85$	0	100	$19,11 \pm 8,30$	0	73	0,84
Nº de embriões degenerados	$1,90 \pm 0,46$	0	4	$1,00 \pm 0,44$	0	4	0,25
Taxa de degeneração (%)	$22,30 \pm 5,00$	0	44	$26,67 \pm 11,36$	0	100	0,70

Tabela 17 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira onda folicular do tratamento, de acordo com os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade).

Variáveis	G - Primeira Onda		
	Anestro	Transição	Ciclicidade
Nº de ovulações	12,40 ± 0,95 ^a	13,10 ± 2,31 ^a	17,00 ± 2,31 ^a
Taxa de ovulação (%)	89,20 ± 4,15 ^a	90,80 ± 3,19 ^a	97,90 ± 1,45 ^a
Nº de Folículos Anovulatórios	1,70 ± 0,70 ^a	1,40 ± 0,40 ^a	0,70 ± 0,57 ^a
Nº de estruturas recuperadas	8,60 ± 1,01 ^{ab}	7,00 ± 1,75 ^b	9,00 ± 1,38 ^a
Taxa de recuperação (%)	69,90 ± 5,61 ^a	55,10 ± 8,56 ^a	54,90 ± 5,73 ^a
Nº de embriões viáveis	3,20 ± 0,81 ^a	3,90 ± 1,94 ^a	3,80 ± 1,51 ^a
Taxa de viabilidade (%)	40,50 ± 11,93 ^a	49,10 ± 13,83 ^a	40,30 ± 10,83 ^a
Nº de estruturas não fecundadas	2,90 ± 1,29 ^a	1,70 ± 0,83 ^a	3,20 ± 1,33 ^a
Taxa de não fecundação (%)	27,20 ± 10,23 ^a	25,40 ± 9,96 ^a	37,10 ± 13,85 ^a
Nº de embriões degenerados	2,30 ± 0,98 ^a	1,10 ± 0,41 ^a	1,90 ± 0,46 ^a
Taxa de degeneração (%)	28,80 ± 11,87 ^a	20,90 ± 7,05 ^a	22,30 ± 5,00 ^a

^{ab}Letras diferem entre estações (P<0,05).

As variáveis, número de estruturas recuperadas e taxa de recuperação, são indicativas da resposta do animal ao tratamento e da eficiência do procedimento de lavagem uterina. Não se observaram diferenças entre grupos (G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda) para nenhum dos períodos estacionais (P>0,05; Tabelas 14, 15 e 16). Efeito do período estacional sobre o número de estruturas foi mostrado no G-PrimeiraOnda para o período de ciclicidade em relação a transição (9,00 ± 1,38 *versus* 7,00 ± 1,75, P<0,05; Figura 17). Já para a taxa de recuperação calculada pelo número de estruturas identificadas no lavado uterino em relação ao número de corpos lúteo demonstrou-se apenas tendência entre os períodos de anestro e transição (69,90 ± 5,61 *versus* 55,10 ± 8,56, P=0,07).

Tabela 18 - Índices da resposta superovulatória e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da última onda folicular do tratamento, de acordo com os períodos estacionais (anestro, transição e ciclicidade).

Variáveis	G - Última Onda		
	Anestro	Transição	Ciclicidade
Nº de ovulações	12,60 ± 1,87 ^a	14,00 ± 1,85 ^a	12,50 ± 2,62 ^a
Taxa de ovulação (%)	83,50 ± 6,17 ^b	93,10 ± 2,25 ^a	88,55 ± 4,45 ^{ab}
Nº de Folículos Anovulatórios	3,10 ± 1,59 ^a	0,90 ± 0,31 ^b	1,20 ± 0,39 ^{ab}
Nº de estruturas recuperadas	5,90 ± 0,90 ^a	9,10 ± 1,21 ^a	6,33 ± 1,12 ^a
Taxa de recuperação (%)	51,70 ± 7,50 ^a	67,00 ± 6,14 ^a	49,30 ± 8,52 ^a
Nº de embriões viáveis	1,80 ± 0,80 ^a	5,70 ± 1,40 ^a	3,44 ± 0,85 ^a
Taxa de viabilidade (%)	32,70 ± 11,74 ^a	58,70 ± 10,95 ^a	53,44 ± 12,06 ^a
Nº de estruturas não fecundadas	2,80 ± 1,27 ^a	1,60 ± 0,87 ^a	1,78 ± 0,86 ^a
Taxa de não fecundação (%)	38,80 ± 11,93 ^a	19,60 ± 10,94 ^b	19,11 ± 8,30 ^b
Nº de embriões degenerados	0,80 ± 0,51 ^a	1,30 ± 0,37 ^a	1,00 ± 0,44 ^a
Taxa de degeneração (%)	17,90 ± 10,61 ^a	17,30 ± 5,13 ^a	26,67 ± 11,36 ^a

As demais variáveis relacionadas a produção de embriões não diferiram entre protocolos hormonais de superovulação, independentemente dos períodos estacionais ($P > 0,05$). Evidenciou-se tendência para o número de embriões degenerados entre os grupos ($2,30 \pm 0,98$ *versus* $0,80 \pm 0,51$, para G-PrimeiraOnda e G-ÚltimaOnda, respectivamente; $P = 0,05$) no período de anestro.

Efeito dos períodos estacionais foi observado para os animais submetidos ao protocolo superovulatório iniciado próximo a última emergência da última onda apenas para a variável taxa de não fecundação ($P < 0,05$; Tabela 18), quando houve maior incidência no período de anestro em relação as demais. Ao avaliar o

número relativo as estruturas não fecundadas nenhuma variação foi registrada ($P > 0,05$).

O número de embriões viáveis, no presente estudo, foi de $3,64 \pm 1,12$ (média total), sendo inferior aos valores médios relatados por MENCHACA et al. (2009), quando em resposta a tratamento tradicional ($5,90 \pm 1,10$) ou protocolo "Dia 0" ($7,90 \pm 1,40$). Valores similares ao do presente estudo foi registrado por OLVEIRA (2008; $3,77 \pm 4,29$), considerando que no referido experimento utilizou-se animais da raça Santa Inês. A ocorrência de estruturas não fecundadas e embriões degenerados está potencialmente associada ao restrito número de embriões transferíveis. Um decréscimo no número de oócitos fecundados em resposta a tratamentos com altas doses de gonadotrofinas exógenas tem sido registrado há vários anos em ovinos (EVANS e ROBINSON, 1980). Mais recentemente, ações colaterais dos protocolos superovulatórios que utilizam associação com eCG são descritas sobre o oviduto. Devido à meia-vida da eCG (até 3 dias; MAPLETOFT et al., 2002), há produção de estradiol após a ovulação com, conseqüente, efeito deletério no oviduto resultando em falhas de fecundação dos oócitos (BARRETT et al., 2004). O emprego da associação do FSH com a eCG no tratamento superestimulatório é usual, entretanto, controverso, principalmente considerando o momento de sua administração. Há vários anos tem integrado os protocolos hormonais de superestimulação, sendo aplicada na segunda metade do tratamento com FSH (i.e. no momento da retirada do dispositivo de progesterona; MENCHACA et al., 2010). A recomendação baseia-se na hipótese de que a suplementação com LH é importante para a maturação final dos folículos, entretanto, sua eficácia é discutível (MENCHACA et al., 2009) devido os registros de efeito sobre o oviduto e, sobre a frequência de regressão luteal prematura (BARRETT et al., 2004). Redução no número de estruturas recuperadas e embriões viáveis (de 85% para 73%) indica que o uso da eCG nesse momento do protocolo não é recomendado (MENCHACA et al., 2010). Recentemente, a eCG tem sido associada ao protocolo concomitantemente a primeira administração de FSH, baseando-se na hipótese de que a suplementação

contribui para diminuir as oscilações e manter altas concentrações de FSH endógeno durante o tratamento gonadotrófico (BARTLEWSKI et al., 2009).

A alta variabilidade das respostas à estimulação ovariana (resposta superovulatória e produção de embriões) é destacadamente o maior desafio frente ao aumento da eficiência dos programas de MOTE em pequenos ruminantes. No presente estudo, pode-se observar pelos valores mínimos e máximo das variáveis relacionadas a resposta superovulatória e de produção de embriões ampla variação entre os animais, independentemente dos protocolos e períodos estacionais em que foram submetidos ao programa de múltipla ovulação. A variabilidade não está unicamente associada a condição folicular ao início do tratamento com FSH, efeito que motivou o presente estudo. Os resultados são dependentes de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais, incluindo: raça; idade; histórico reprodutivo, destacando-se número de partos, período pós-parto e prolificidade da fêmea; estacionalidade; nutrição; e condição climática a que os animais são submetidos (GORDON, 1997; COGNIÉ et al., 2003; BARTLEWSKI et al., 2007; VEIGA-LOPEZ et al., 2008). Quando se refere as preparações de gonadotrofinas há variações relacionadas ao produto comercial, lote, dose, frequência de aplicações utilizadas (BARTLEWSKI et al., 2007). Um reduzido intervalo entre sucessivos tratamentos pode interferir também na resposta subsequente (COGNIÉ, 1999). Apesar de inúmeros avanços técnicos na tentativa de minimizar ou eliminar esses fatores, a variação da resposta ovariana continua a limitar as aplicações comerciais e científicas da superovulação.

6. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos achados desta investigação permitiu concluir que:

- Os perfis séricos de progesterona durante os protocolos de superovulação foram representativos das intervenções realizadas em cada tratamento;
- A população folicular presente nos ovários ao início do tratamento superestimulatório com a gonadotrofina exógena, correspondente ao dia do

surgimento de uma onda folicular, não se restringiu a folículos em emergência. Houve registro, em alguns animais, de folículos dominantes de ondas anteriores;

- Os protocolos superovulatórios iniciados próximo as emergências da primeira e última ondas foliculares foram capazes de induzir resposta superovulatória satisfatória, quando a maioria das ovelhas (68,33%) responderam com número igual ou superior a 11 corpos lúteos;

- A concentração de progesterona no momento da colheita de embriões foi superior no período estacional da transição para os protocolos iniciados próximo as emergências da primeira ou última ondas foliculares;

- Não foi registrada correlação entre o número de folículos pequenos (2 - 4,25 mm) presentes ao início do tratamento superestimulatório com FSH e o número de corpos lúteos em resposta aos protocolos superovulatórios;

- A resposta superovulatória, indicada pelo número de corpos lúteos e concentração de progesterona no momento da colheita de embriões, não sofreu efeito dos protocolos de superovulação iniciados próximo as emergências da primeira ou última ondas foliculares, independentemente do período estacional;

- Maior taxa de ovulação foi registrada para o protocolo superovulatório iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular, apenas no período de ciclicidade;

- As variáveis relacionadas a produção de embriões não sofreram efeito dos protocolos hormonais de superovulação;

- O número de estruturas recuperadas em resposta ao protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular foi influenciado pelo efeito do período estacional;

- Efeito do período estacional foi registrado sobre a taxa de não fecundação para os animais submetidos ao protocolo superovulatório iniciado próximo a última emergência da última onda;

- Houve alta variabilidade das respostas à superestimulação ovariana para as variáveis relacionadas a resposta superovulatória e produção de embriões.

7. REFERÊNCIAS¹⁷

- ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T.; VISINTIN, J.A. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Brazilian Journal of Veterinarian Research in Animal Science**, v.36, p.136-143, 1999.
- ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.19, p.31-42, 1983.
- BARRETT, 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 injection of 500 IU of PMSG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in and out of the breeding season in ewes. **Theriogenology**, v.61, p.311–327, 2004.
- BARRETT, D.M.W.; BARTLEWSKI, P.M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K.L.; HUCHKOWSKY, S.L.; EPP, T.; RAWLINGS, N.C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v.69, p.827–836, 2008.
- BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. **Theriogenology**, v.52, p.115–130, 1999.
- BARTLEWSKI, P.M.; ALEXANDER, B.D.; RAWLINGS, N.C.; BARRETT, D.M.W.; KING, W.A. Ovarian responses, hormonal profiles and embryo yields in anoestrous ewes superovulated with Folltropin[®]-V after pretreatment with

¹⁷ De acordo com as normas da ABNT-NR 6023

- medroxyprogesterone acetate-releasing vaginal sponges and a single dose of oestradiol-17 β . **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.299–307, 2008.
- BARTLEWSKI, P.M.; FUERST, K.J.; ALEXANDER, B.D.; KING, W.A. Systemic Concentrations of Endogenous and Exogenous FSH in Anoestrous Ewes Superstimulated with Folltropin-V. **Reproduction in Domestic Animal**, v.44, p.353–358, 2009.
- BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.259–268, 2011.
- BERLINGUER, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; LEONI, G.; MOSSA, F.; BEBBERE, D.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J.A.F.; VEIGA-LOPEZ, A.; NAITANA, S. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH- treated ewes. **Domestic Animal Endocrinology**. v.32, n.4, p.303–314, 2007.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**. v.39, p.193–204, 1995.
- COGNIÉ, Y. State of art in sheep–goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p.105–116, 1999.
- COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**. v.59, p.171-188, 2003.
- CORDEIRO, M.F.; LIMA-VERDE, J.B.; LOPES-JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; FARIAS, L.N.; SALES, H.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F.

- Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**. v.49, p.19-23, 2003.
- DEMOUSTIER, M.M.; BECKERS, J.F.; VAN DER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, J.L.; ECTOR, F.R. Determination of porcine plasma levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**. v.30, p.379-386, 1988.
- DRIANCOURT, D.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.
- EVANS, A.C.O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.289-306, 2003.
- EVANS, A.C.O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M.P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v.53, p.699-715, 2000.
- EVANS, G., ROBINSON, T.J. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and the anoestrus. **Journal Agriculture Science**. v.94, p.69–88, 1980.
- FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em caprinos e ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, **Anais...**, Goiânia, 2005.
- FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. Reprodução Assistida em Pequenos Ruminantes. **Revista de Ciências Agrárias**, v.43, p.1-13, 2005.

- FONSECA, J.F.; VIANA, J.H.M.; BRUSCHI, J.H.; ZAMBRINI, F.N.; PALHÃO, M.P.; SANTOS, A.F.A. Resposta superovulatória em cabras Saanen lactantes utilizando curtos protocolos de exposição à progesterona e somatotropina bovina recombinante (rbST). **Acta Scientiae Veterinariae**. v.32, p.243, 2005.
- FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; ZAMBRINI, F.N.; VIANA, J.H.M.; AMORIM, L.S.; CAMARGO, L.S.O. Superovulação de cabras utilizando a primeira onda folicular do ciclo estral. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, p.509, 2006.
- FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; BRUSCHI, J.H. Sincronização de estro e Superovulação em Caprinos e Ovinos. In: 2º Simpósio de Caprinos e Ovinos, Belo Horizonte/MG – UFMG, **Anais...** p.167-195, 2007.
- FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; CAMARGO, L.S.A. Estado da Arte de ovócitos e embriões de caprinos e ovinos: passado, presente, futuro. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.38, p.353-369, 2010.
- FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; VIANA, J.H.M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 35, p.113-117, 2011.
- FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 1ª Ed., 179-194, 2002.
- FUKUI, Y.; OKADA, M.; ISHIDA, M. Incidence of premature luteal regression in ewes superovulated with a single injection of follicle-stimulating hormone combined with equine chorionic gonadotropin. **Journal of Reproduction and Development**. v.44, p.407-412, 1998.

- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICHE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K.
Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**. v.55,
p.1187-1194, 1996.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIÁN, A.
Effect of follicular development and superovulatory protocol on ovulation rate in
ewes. In: I Congresso Ibérico de Reprodução Animal, Estoril (Portugal),
Anais..., v.2, p.40-41, 1997.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M.J.; SOUZA,
C.J.H.; GROOME, N.P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; LOPEZ-SEBASTIÁN, A.;
BAIRD, D.T. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to
exogenous FSH in sheep. **Theriogenology**. v.57, p.1263-1272, 2002.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J.A.; DÍAZ-DELFA, C.; GARCIA-GARCIA,
R.M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M.J.; LÓPEZ-
SEBASTIÁN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response
of dairy goats to FSH treatment. **Small Ruminant Research**. v.48, p.9-14,
2003.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCIA-GARCIA, M.R.,
SOUZA, C.J.H. Effect of GnRH antagonist treatment on gonadotropin secretion,
follicular development and inhibin A secretion in goat. **Theriogenology**. v.61,
p.977–985, 2004.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA,
R.M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M.A. Effects of progestagens and
prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep.
Theriogenology. v.63, p.2523–2534, 2005.

GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião**, v.25, p.6-9, 2006.

IETS. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3ª edição, Illinois Stringfellow, D. A. & Seidel, S. M., 180 p., 1998.

ISHWAR, A.K.; MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v.19, n.1, 35-43, 1996.

LETELIER, C.A.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R.A.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J.A.F.; FLORES, J.M.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. **Theriogenology**. v.71, p.676–682, 2009.

LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L.; GUERRA, M.M.P.; ALVES, J.D.R.F.; NETO, J.E.; RABELO, M.C. Eficiência de diferentes métodos de coleta embrionária em caprinos (resultados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.20, 63-68, 1996.

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

LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GONZÁLES-BULNES, A.; MORENO, J. S. Control y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Compendio de Conferencias. **XXIX Curso Internacional de Reproducción animal**. Madrid. p.43-52, 2006.

MAYORGA, I.; MARA, L.; SANNA, D.; STELLETTA, C.; MORGANTE, M.; CASU, S.; DATTENA, M. Good quality sheep embryos produced by superovulation

- treatment without the use of progesterone devices. **Theriogenology**, v.75, p.1661-1668, 2011.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.42, p.601-611, 2002.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E.. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. **Theriogenology**. v.57, p.1411–1419, 2002.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**. v.68, p.1111–1117, 2007.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**. v.72, p.477–483, 2009.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**. v.22, p.113–118, 2010.
- MORAND-FEHR, P.; BOYAZOGLU, J. Present state and future outlook of the small ruminant sector. **Small Ruminant Research**, v.34, p.175-188, 1999.
- NAKAYAMA, J.; ARISAKA, O. Regulation of gonadotropin secretion. *Nippon Rinsho* v.55, p.2855–2859, 1997.

OLIVEIRA, M.E.F. Efeito da administração do LH ao final do tratamento superestimulatório na taxa de ovulação e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês. Jaboticabal, SP: Unesp-FCAV, **Dissertação**, 67p., 2008.

OLIVEIRA, M.E.F. Estado da arte da superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 65-70, 2011a.

OLIVEIRA, M.E.F. Múltipla ovulação e transferência de embriões em pequenos ruminantes. **Revista on line do portal FarmPoint.**, Radar Técnico: Reprodução Animal. Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/multipla-ovulacao-e-transferencia-de-embrioes-em-pequenos-ruminantes-69264n.aspx>. Publicado em: 31/01/2011. Acesso em: 20/08/2011, 2011b.

OLIVEIRA, M.E.F.; VICENTE, W.R.R.; COSTA, D.A.C.P.; CORDEIRO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SOUSA S.F., RODRIGUES L.F.S. Effects of LH administration at end of the FSH superovulatory regimen on ovulatory period in Santa Inês sheep. **Hungarian Veterinary Journal**. Budapest, p.129, 2008a.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; CORDEIRO, M.F.; PIERONI, J.S.P.; SOUZA, S.F.; SANTOS, I.C.C.; RODRIGUES, L.F.S.; FONSECA J. F.; VICENTE W.R.R. Efeito da administração do LH ao final do tratamento superovulatório sobre as taxas de ovulação e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.598, 2008b.

OLIVEIRA, M.E.F.; Santos, I.C.C.; PIERONI, J.S.P. ; FERREIRA, R.M.; CORDEIRO, M.F.; NASCIMENTO, P.M.P.; SOUZA, S.F.; FONSECA, J.F.; VICENTE, W.R.R. Superovulatory response and embryo production

influenced by the addition of LH and effect of the repeatability in Santa Inês sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21. p.171, 2009.

PAULA–LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.1169-1177, 2002.

PICAZO, R.A.; COCERO, M.J.; BARRAGAN, M.L.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. **Theriogenology**. v.45, p.1065-1073, 1996.

RANIO, V. PMSG-dose in Finn-sheep embryo production. **Theriogenology**. v.35, p.261, 1991.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P.A.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 127-177, 2002.

ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CUIBIU, E.P.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M.C. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. **Biology of Reproduction**. v.61, p.209-218, 1999.

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

- RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; IBARRA, D. Use of serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. **Small Ruminants Research**, v.21, p.105-111, 1996.
- RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES, C.; RIVERO, A.; ANDADAMS, G.P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, v.47, p.1479-1488, 1997.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Dinâmica folicular, sincronização de estro e superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, p.251-261, 2006.
- SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEDJA, O.; CERBÓN, J.L.; CABALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**. v.50, p.1039-1052, 1998.
- SAS Institute, 2002–2008. **SAS user's guide: statistics**. Versão 9.2 para o Windows, SAS Institute, Cary, NC.
- SCUDAMORE, C.L.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; KENNEDY, D.J.; IRELAND, S.; ROBERTSON, I.S. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. **Theriogenology**, v.35, n.2, 329-37, 1991.
- SILVA, J.C.; QUINTELA, A.; ANDRADE MOURA, J.C.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; MARTINS, L.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; GUSMÃO, A.L. Avaliação da colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.32, p.90, 2004.

TRALDI, A.S. **Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Ruminantes**. LBOC - VRA - FMVZ - USP, 85p., 2002.

ULLOA-AGUIRRE, A.; MALDONADO, A.; DAMIAN-MATSUMURA, P.; TIMOSSI, C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. **Archives of Medical Research**, v.32, p.520–532, 2001.

VALLET, J.C.; BARIL, G. Effect of time of laparoscopic intrauterine insemination in superovulated dairy goats. In: VI Scientific Meeting of Association Européenne de Transfert Embryonnair, **Proceeding...** Lyon, 180p., 1990.