

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITOS DO BENZOATO DE ESTRADIOL E/OU GnRH NA
FUNÇÃO OVARIANA DE OVELHAS SANTA INÊS**

CARMO EMANUEL ALMEIDA BISCARDE

Botucatu
2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

CARMO EMANUEL ALMEIDA BISCARDE

**EFEITOS DO BENZOATO DE ESTRADIOL E/OU GnRH NA
FUNÇÃO OVARIANA DE OVELHAS SANTA INÊS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.Dr. Sony Dimas Bicudo.

Botucatu
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Biscarde, Carmo Emanuel Almeida.

Efeitos do benzoato de estradiol e/ou GnRH na função ovariana de ovelhas Santa Inês / Carmo Emanuel Almeida Biscarde. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Ovários – Hormonioterapia. 3. Santa Inês (Raça de ovino). 4. Ovelhas.

Palavras-chave: Biotécnicas de reprodução; Função ovariana; Ovelhas.

CARMO EMANUEL ALMEIDA BISCARDE

**EFEITOS DO BENZOATO DE ESTRADIOL E/OU GnRH NA
FUNÇÃO OVARIANA DE OVELHAS SANTA INÊS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre e aprovada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof Dr Nereu Carlos Prestes
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alberto Lopes Gusmão
Membro
Departamento de Patologia Veterinária e Clínicas
EMEV – UFBA

Botucatu, 01 de julho de 2010.

Dedico estes anos de labuta pelas bandas de São Paulo aos meus pais que não pouparam esforços para educar seus filhos. A estes dois exemplos de desapego e dedicação aos filhos; é de vocês este trabalho!

AGRADECIMENTOS

O agradecimento revela uma das dimensões mais profundas do ser humano, de que existimos por pura gratuidade. Não nos demos a existência, a recebemos de outros. Ao nos conceberem e ao nos receberem na hora do nascimento, nossas mães tiveram amor incondicional e cuidado para conosco. Se tudo dependesse de nós, não nasceríamos atados ao cordão umbilical de nossas mães. A essência do agradecimento é dar e receber gratuitamente, independente de nossos esforços e méritos. A mútua doação significa amizade, amor, e seu efeito maior é a felicidade.

(Leonardo Boff)

Agradeço primeiramente a Deus por tudo de bom que me proporcionou nestes anos de proações, conhecimentos e proações.

Mais uma vez, aos meus pais, seres responsáveis pelo meu existir. Agora e sempre sou muito feliz em poder estar bem mais perto de vocês.

Ao meu avô e minhas avós, seres de grande luz, onde a sabedoria dos anos supera o cansaço de tantos e tantos anos dedicados ao trabalho e o viver pela família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, meus sinceros agradecimentos pela atenção, paciência, educação, amizade e o aceite desafiador em me orientar desde o primeiro momento da residência até o mestrado, sou intensamente grato por isto!

Aos meus tios Pedro e Emanuel, sem os quais o sonho de realizar a pós graduação (residência e mestrado) não seria possível.

Aos meus tios e primos paternos e maternos pela acolhida e o querer bem. Volta e meia os telefonemas de vocês me aliviavam a saudade, eu ficava tão feliz com isto.

Aos professores do departamento de Reprodução Animal da Unesp-Botucatu, Nereu Carlos Prestes, grande exemplo de amigo e de educador, o poema "Carmosina da Xiribinha" estará sempre comigo; João Carlos Pinheiro Ferreira, grande amigo e apreciador da boa música; Maria Denise Lopes, pessoa de coração grandioso e de grande conhecimento, muito obrigado por me ensinar as muitas coisas acerca da reprodução de pequenos; Frederico Ozanam Papa, pessoa de extrema sensibilidade, disfarçados na sua dureza do "tratar"; Eunice Oba, pessoa de grande benevolência, obrigado pelo material de suporte no transcorrer do

experimento; Cezinande Meira, grande paz e tranquilidade no tratamento; Fernanda Landim-Alvarenga, grande cabeça pensante da reprodução animal; e Marco Antônio Alvarenga, grande amigo.

Aos professores da Universidade Federal da Bahia, Alberto Lopes Gusmão, nunca esquecerei o telefonema no primeiro mês de estada em Botucatu, me dando forças para continuar num ambiente ainda estranho e sem pessoas próximas; Geovani Bonina, meu grande pai da EMEV-UFBA; Marcos Chalhoub, pessoa que me abriu os caminhos na reprodução animal; José Vasconcelos, meu orientador de iniciação científica; José Carlos Andrade Moura e Antônio Lisboa Ribeiro Filho.

A Rodrigo Bittencourt companheiro desde o primeiro momento em que adentrei no ramo da reprodução animal, estreitando-se no primeiro ano de Botucatu, dividindo morada. Meu muito obrigado a ajuda nos diferentes momentos da minha vida acadêmica.

À amizade construída em Botucatu com respeito e mutualismo. Marcel – o Velho Brexa, uma pena ter te conhecido mais tarde do que os outros, grande companheiro nos momentos de grande solidão; Heder e Eros, grandes companheiros de casa; Claudinha e Hugo, não posso falar de um sem relatar o outro, muito obrigado pelas horas e horas de ajuda e conversa; Márcio Teoro, grande companheiro, nos momentos em que não havia ninguém em Botucatu, lá estava o Márcio. À paciência das meninas da Professora Denise, Guta (Gugu), Bibi (Viviane), Bethânia, Ana Isabel, Bel e a mais recente Renatinha. A Luís Magalhães e Letícia Crocomo, meus sinceros agradecimentos pelas noites mal dormidas durante a ajuda no experimento durante as festas de fim de ano, mas vocês estavam lá firme, sem contar das minhas piadas de cunho “político” que Luís tinha que ouvir, desculpa e o meu muito obrigado, meu amigos. Carla e Gustavo. Ao pessoal do laboratório do Professor Papa, André Crespillo, Zé Dell’Aqua, Camila, Cely, Priscila, e Bruninho. Bió, juntamente com Professor Henrique, a Liliane Celita (Mal), pelo companheirismo nos bons e maus momentos, o grandioso Duroc (Eduardo), o companheiro Gabriel Felício, Bruna de Vita, Ian, Tiago Monteiro, Leandro Rodello, Jeanne, Peres, Ana Lúcia, Ivan, Eric, Maíra, Renata (Erlichia), Carol, Carla (Limosin), Luciana Fachini, Guilherme (Ornito), Veridiana, Cassinha e Marcel.

Às amigas e o colega de Residência, Rosiara Dias Maziero, um beijo grande do papai Noel mais magro do pólo Norte; Maria Clara Costa Matos, a escrivaninha ainda “vive”; e Gabriel Augusto Monteiro.

Aos grandes amigos de Nova Soure, onde a saudade era amenizada pelos inúmeros telefonemas aos finais de semana em momentos de alegria, em que uns falavam: “Manda parar este berreiro, aí!!!”.

Aos grandiosos amigos da Universidade Federal da Bahia, que em momentos de alegria e tristeza continuaram unidos e elevando o nome da medicina veterinária.

Aos formandos em medicina veterinária de 2008 grandes companheiros na época de residência e tive o prazer de ser colega dos que continuaram no mestrado e acompanhando os que optaram pela residência.

Aos funcionários da FMVZ-Unesp Márcio Figueira, Edilson, Walter, Cristina, Val, José Carlos, Murilo, Zé Luis e Tico, que Deus o tenha.

Aos funcionários da pós graduação da FMVZ-Unesp José De Lalla, Maria e Denise.

A pessoa que me conquistou e, graças a Deus, consegui me juntar a ela aqui na Bahia, diminuindo dificuldade da saudade e da distância. Cláudia Kazumi Kiya, obrigado por ter entrado na minha vida.

Por fim a Bahia e ao Bahia por não saírem um só momento do meu pensamento, sendo uma das forças que me faziam continuar, para um dia poder voltar.

Vivo na Bahia uma vida tão baiana que, insensivelmente, me vou sentindo afastado do presente e do futuro e preso a não sei que encanto da inação e do passado. Porque a Bahia, como já lhe tenho dito várias vezes, é uma terra que já chegou e que nada mais espera senão conversar e sorrir tolerante e displicentemente sobre a vida... Penso que, guardadas as proporções, o ambiente em que se vive, Bahia, tem algo de comum com o clima moral e mental da China, ou da Grécia ao tempo da ocupação romana... A ação e o trabalho, a luta, enfim, passou para o segundo plano, é qualquer coisa que se faz porque não se pode de todo deixar de fazer. O que importa, porém, o que dá prazer e acende nos olhos a alegria de viver não é triunfo, nem o êxito – mas a conversa fiada, o comentário amável, o convívio humano pelo convívio humano. Neste sentido, tenho que a Bahia é uma das terras mais civilizadas do mundo – tão civilizada que já não cogita de civilizar-se...

(Anísio Teixeira)

“Felicidade se acha é em horinhas de descuido”
(João Guimarães Rosa)

*“Educar é crescer. E crescer é viver.
Educação é, assim, vida no sentido
mais autêntico da palavra.”*
(Anísio Teixeira)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01.** Representação de corpo lúteo (CL) funcional (ovelha 23) e não funcional (ovelha 19). O ovário da mesma ovelha é apresentado como: (A) Um mapa ovariano feito com base no monitoramento ultrassonográfico 12 horas antes do abate; (B) Fotografia da imagem ultrassonográfica do ovário *in vivo*; (C) Ovelha 23 com um ovário apresentando 2 CLs funcionais sendo que um apresentava uma pequena cavidade (3x2mm) e ovelha 19 um CL não funcional (6x6mm) que foi superestimado pelo exame ultrassonográfico (ver em (A)). *Adaptado de VIÑOLES et al. (2004)*..... 27
- Figura 02.** Representação de folículos com diferentes diâmetros e CL. A mesma estrutura de gráficos propostos na figura 01. Onde na ovelha 5 em (C) foi encontrado um CL não funcional (8x7mm), onde o tamanho da estrutura foi superestimado no exame ultrassonográfico (vê-se em (A)). *Adaptado de VIÑOLES et al. (2004)*..... 27
- Figura 03.** Imagem ultrassonográfica de folículos (F) e corpo lúteo (CL); Vê-se em (D) um CL cavitário (*Adaptado de SCHRICK et al., 1993*)..... 28
- Figura 04.** Imagem ultrassonográfica de ovário de ovelha Santa Inês com a delimitação de corpo lúteo através de traço, ao lado um folículo (estrutura hipoecóica em escala de 10 mm) 68
- Gráfico 01.** Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo Controle. onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF2alfa; d3 inserção da esponja e d7 pela manhã retirada da esponja e aplicação de eCG. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente..... 83
- Gráfico 02.** Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo BE. onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF2alfa nos animais de todos os grupos; d1 aplicação de Benzoato de Estradiol; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja e aplicação de eCG. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente..... 83

Gráfico 03. Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo GnRH, onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF2alfa nos animais; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja de todos animais; d8 à tarde aplicação de Lecirelina. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente..... 84

Gráfico 04. Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo BE-GnRH. Onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF2alfa nos animais de todos os grupos; d1 aplicação de Benzoato de Estradiol ; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja de todos animais; d8 à tarde aplicação de Lecirelina. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente..... 84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Frequência acumulada das ovulações em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH)..... 67
- Tabela 02.** Parâmetros de estro e ovulação em ovelhas Santa Inês submetidas à sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH)..... 68
- Tabela 03.** Avaliação das áreas ultrassonográficas dos corpos lúteos (CL) pelos modos de contorno “traço” e “elíptico” após sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH)..... 68
- Tabela 04.** Duração do estro, diâmetro (\emptyset) do folículo ovulatório, níveis plasmáticos de progesterona (P4) no quarto dia pós ovulação e áreas luteais de “traço” e “elipse” após sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH)..... 69
- Tabela 05.** Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) e grupos de tratamento, onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF₂alfa nos animais de todos os grupos; d1 aplicação de Benzoato de Estradiol nos grupos BE e BE + GnRH; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja e aplicação de eCG em todos animais; d8 à tarde aplicação de Lecirelina nos grupos GnRH e BE+GnRH. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente..... 85

BISCARDE, C.E.A. **Efeitos do benzoato de estradiol e/ou GnRH na função ovariana de ovelhas Santa Inês**. Botucatu, 2010. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A manipulação do ciclo estral e o conhecimento dos eventos ovarianos associados à hormonioterapia são necessários para que se tenha sucesso nas biotecnologias da reprodução como IATF, superovulação e transferência de embriões. Dentre os hormônios utilizados na manipulação do crescimento folicular pode-se destacar o benzoato de estradiol e o GnRH, os quais são amplamente utilizados na reprodução bovina. Tem-se como objetivo deste trabalho avaliar a interferência destes dois hormônios na função ovariana, buscando evidências de interferência na função lútea. Foram realizados três experimentos, divididos em dois trabalhos. No experimento I (EI) utilizou-se 24 ovelhas divididas em quatro protocolos de curta duração, cada um com seis animais, sendo o grupo Controle (GC-EI), o grupo BE-1mg (BE-EI), o grupo GnRH-25 μ g (GnRH-EI) e o grupo BE-GnRH (BE-GnRH-EI) com a observação dos atributos ultrassonográficos tanto dos folículos quanto dos corpos lúteos. No experimento II(EII), 72 ovelhas foram divididas em dois grupos. O grupo 1 (G1-EII – n=30) recebeu o mesmo tratamento do grupo GnRH do experimento I, no grupo 2 (G2EII – n=42) fêmeas foram submetidas a protocolo longo com 12 dias de progesterona e eCG no momento de retirada do pessário vaginal. Neste experimento foi realizada IATF via transcervical 52 horas após término do tratamento com progesterona. O desaparecimento do folículo pré-ovulatório foi constatado em 23 dos 24 animais, uma ovelha do BE-GnRH não ovulou e foi excluída do experimento. O tamanho médio do maior folículo pré-ovulatório foi de 7,3mm (GC); 7,0mm (BE); 6,8mm (GnRH); 7,4mm (BE-GnRH) não havendo diferença entre eles ($P>0,05$), sendo encontrado 1,83; 1,16; 2; 1,4 folículos ovulados por animal para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Dados relacionados ao início do estro após a retirada da esponja e duração do estro obteve-se para os GC 32/38,6; BE 37/69,3; GnRH 29,3/37,3; BE-GnRH 44/68 horas, respectivamente. Tempo de ovulação foi GC 65,3; BE 88; GnRH 53,3; BE-GnRH 82,4 horas após a retirada da esponja. Não houve correlação entre o tamanho do maior FPO e a dosagem de progesterona, porém quando se levou em consideração estas dosagens de progesterona e o número de ovulações, observou-se correlação, da mesma forma observou-se correlação entre as dosagens de progesterona e o número de ovulações ($r=0,616$; $P<0,01$). Nas dosagens de progesterona, o grupo tratado com GnRH apresentou valor maior ($P=0,017$) comparado ao grupo tratado com BE, porém quando comparada aos grupos restantes, não foi constatada diferença. A taxa de gestação foi de 46,6% e 28,6% para os grupos G1EII e G2EII, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre os respectivos grupos ($P>0,05$). Não houve efeito benéfico da utilização do GnRH sobre nenhum dos parâmetros estudados, entretanto a utilização do BE no início do tratamento, promoveu uma maior dispersão das ovulações, assim como um prejuízo na função luteal das ovelhas, refletindo nas menores concentrações plasmáticas de progesterona. Deve-se realizar mais estudos a respeito da utilização do GnRH como indutor de ovulação, como fator luteotrófico e seus reais benefícios acerca das taxas de gestações.

Palavras-chave: Ovelhas. Função ovariana. Biotécnicas da reprodução.

BISCARDE, C.E.A. **Effects of estradiol benzoate and/or GnRH upon the ovarian function in Santa Ines ewes.** Botucatu, 2010. 101p. Dissertation (Master's degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

It is necessary good knowledge of estrus cycle management and ovarian events related to hormone therapy in order to pursue successful FTAIA, superovulation and embryo transference. Among the hormones selected for the manipulation of follicular growth it can be pointed out the estradiol benzoate and the GnRH as the ones that are widely used in the bovine reproduction. Their effects upon the ovarian function of ewes as well as their action upon different breeds are still unknown. This study aims at evaluating the interference caused by these two hormones in the ovarian function, searching for any evidence of interference with luteal function. Two experiments were performed in this study. Experiment I (EI) used four short-time protocols, with 6 animals each and named as follow: control group (CGEI), estradiol benzoate (EB) group (EB-EI), GnRH group (GnRH-EI) and EB-GnRH group (EB-GnRH-EI). All of them passed through follicle and corpus luteum ultrasound examination. For experiment II, it was used 72 ewes divided into 2 groups. Group 1 (G1EII, n = 30) received the same treatment of G3EI from experiment I. In Group 2 (G2EII, n=42), ewes were subjected to a long-time protocol with 12 days of progesterone and eCG at the end of treatment. In this experiment it was performed transcervical FTAI 52 hours after the end of progesterone treatment. There had been no correlation between the biggest preovulatory follicle (POF) and the progesterone level. However, there was correlation between progesterone level and number of ovulations ($r=0.616$; $P<0.01$). As for the progesterone level the GnRH group presented higher values ($P=0,017$) when compared to group with estradiol benzoate, but when compared to the other groups there was no significant difference. In the experiment II, pregnancy rates were 46.6% and 28.6% for groups G1 and G2, respectively with no significant difference ($P>0.05$). Nevertheless further studies shall be performed with regard to the use of GnRH as ovulation inducer and luteotrophic factor, and its benefits towards the pregnancy rates.

Keywords: Ewes, ovarian function, reproductive biotechniques

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Fatores que afetam o desenvolvimento folicular.....	19
2.2 Estudo dos eventos ovarianos.....	23
2.3 A ultrassonografia no estudo ovariano.....	24
2.4 O Estradiol.....	28
2.5 O GnRH.....	31
2.6 Potencialidade na utilização do GnRH.....	32
2.7 Condicionantes à ação do GnRH.....	33
2.8 Análogos de GnRH (agonistas e antagonistas).....	35
2.9 Momento de administração do GnRH, a ovulação e a função luteal.....	38
CAPÍTULO II	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1 Experimento I.....	48
2.1.1 Animais e local do experimento.....	48
2.1.2. Tratamento hormonal.....	48
2.1.3 Exame ultrassonográfico.....	49
2.1.4 Observação do estro.....	50
2.1.5 Colheita de sangue e dosagem hormonal.....	50
2.2 Experimento II.....	51
2.2.1 Animais e local do experimento.....	51
2.2.2 Tratamento hormonal.....	51
2.2.3 Inseminação artificial.....	52
2.2.4 Colheita de sangue e dosagem hormonal.....	52
2.2.5 Diagnóstico de gestação.....	53
2.2.6 Análise estatística para ambos os experimentos.....	53
3. RESULTADOS.....	54
3.1 Experimento I.....	54
3.2 Experimento II.....	56
4. DISCUSSÃO.....	57
Agradecimentos.....	61
5. REFERÊNCIAS.....	62
Anexos 1.....	67
CAPÍTULO III	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76

4. CONCLUSÕES.....	79
Agradecimentos.....	80
5. REFERÊNCIAS.....	81
Anexos 2.....	83
<u>CAPÍTULO IV</u>	86
1. PONTOS CRÍTICOS E REPERCUSSÕES.....	86
2. CONCLUSÕES GERAIS.....	88
3. REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura quando explorada racionalmente e em sintonia com os aspectos agroecológico, econômico e social, representa uma excelente alternativa para os diferentes ecossistemas existentes no Brasil (SIMPLÍCIO, et al., 2003). Esta é a atividade pecuária que mais cresce no país, tendo em vista que o rebanho bovino já se encontra em patamares elevados.

Nas últimas décadas, a ovinocultura brasileira passou por grandes modificações em sua cadeia produtiva, devido à notável expansão dos mercados interno e externo (LEITE, 2000). Em 2006 o país contava com um efetivo de 17.105.572 ovinos, sendo que a região sudeste despontava como zona de alto potencial na produção de carnes, devido ao elevado crescimento do número de animais e ao alto poder de consumo por parte da sua população (ANUALPEC, 2006).

Tendo em vista estes números, portanto há necessidade de se incrementar os ganhos com esta atividade, daí a importância das biotecnologias da reprodução, sendo estas extremamente necessárias na exploração pecuária moderna. Dentre as biotécnicas pode-se destacar a sincronização e indução do estro e ovulação, que estão intrinsecamente relacionadas com a taxa de concepção. Como a ovinocultura é uma atividade em franca expansão, busca-se nesta biotécnica aliada à inseminação artificial em momento pré-estabelecido (IATF), uma maneira de suprimir a identificação do estro, uma vez que a detecção do estro representa um dos principais entraves para o bom desempenho da inseminação artificial em um

rebanho, além do fato de que a ovelha apresenta um comportamento sexual que dificulta a observação do estro. Além disso, essa biotécnica concentra os nascimentos, permite a quebra de sazonalidade, o que agrega valor ao produto final pela homogeneidade na oferta e pelo momento em que é ofertado no mercado.

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pode ser utilizado no controle do ciclo estral, com o objetivo de sincronizar a onda de crescimento folicular. Quando administrado na fase luteal do ciclo, promove regressão "luteinização" dos folículos presentes nos ovários e indução do surgimento de uma nova onda de crescimento folicular. Na fase folicular do ciclo, induz uma significativa elevação dos níveis de LH, desencadeando o pico pré-ovulatório do referido hormônio (PHILLIPS et al., 1990; EVANS et al., 1996).

Na IATF o uso do GnRH visa promover o crescimento folicular e a indução de ovulação num curto espaço de tempo.

Assim, constitui-se objetivo deste trabalho a observação da interação do benzoato de estradiol (BE) e do GnRH com a função ovariana da ovelha e com estes hormônios em protocolos de indução da ovulação de folículos jovens e prontos para promoverem um aumento nas taxas de gestação na espécie ovina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As ovelhas são animais poliéstricos estacionais de dias curtos, ou seja, sua estação reprodutiva se concentra nos meses de menor exposição à luz ao longo do ano, o que não quer dizer que nos demais períodos não haja atividade ovariana (EVANS & MAXWELL, 1991). Noel et al. (1993), em estudo realizado ao longo do ano em ovelhas *Suffolk* monitoradas por laparoscopia, observaram desenvolvimento folicular, sem ocorrência da ovulação nas estações de primavera e verão.

Utilizando a ultrassonografia em tempo real, com transdutor de frequência 7,5 Mhz, associada a dosagens hormonais, pesquisadores canadenses avaliaram ovelhas em anestro e observaram desenvolvimento folicular, porém sem ocorrência de pico de LH, essencial para ocorrência de ovulação nos folículos dominantes. Por outro lado foram observadas oscilações nas concentrações de estrógenos e progesterona, sendo este último devido luteinização de folículos (BARTLEWSKI et al., 1998).

2.1 Fatores que afetam o desenvolvimento folicular

O desenvolvimento folicular pode ser dividido em duas fases, pré-antral e antral, que ocorrem, respectivamente, independente e dependente das gonadotrofinas. O folículo antral desenvolve-se em maior velocidade nas 48 horas antecedentes a ovulação (CAHILL, 1981), demonstrando que as gonadotrofinas promovem um aumento na taxa de crescimento folicular. A dependência da ação gonadotrófica, por parte do folículo ovariano em ovelhas, ocorre quando este alcança cerca de 2 mm (DRIANCOURT, 2001).

Os folículos podem ser classificados como estrógeno ativos (não atrésicos) e estrógeno inativos (atrésicos) (CARSON et al., 1981).

O desenvolvimento folicular na fase pré-antral é controlado por ação local de fatores de crescimento tais como: fator de crescimento semelhante à insulina (gonadotróficos. *insulin like growth factor*, IGF), membros da superfamília de fatores de crescimento de transformação- β e de transformação- α (*transforming growth factor- β* , TGF- β), de fibroblastos (*fibroblast growth factor*, FGFs) e endotelial (*endothelial growth factor*, EGF) (WEBB et al., 1998); estes controles, parácrino e autócrino, modulam a ação dos hormônios.

Destaca-se a ação dos IGF, TGF- β e a ativina, que potencializam a ação do hormônio folículo estimulante (FSH), estimulando a aromatização dos andrógenos por parte das células da granulosa, promovendo uma maior liberação de estrógeno para o antro (GONZALEZ-BULNES et al., 2004). O EGF, quando associado à inibina, promove o declínio na ação do FSH para promoção da aromatização. Por outro lado, quando associado à ativina, modula de forma negativa a ação do hormônio luteinizante (LH) nas células da teca para a produção de andrógenos. O IGF e a inibina, diferente dos fatores anteriores, aumentam a ação do LH para a produção destes andrógenos, os quais serão os precursores do estrógeno (LEYVA et al., 1998).

O recrutamento é o evento ovariano que forma um *pool* de pequenos folículos antrais que se desenvolvem sobre ação do hormônio folículo estimulante. Neste momento há baixos níveis circulantes de hormônio luteinizante, estradiol e inibina (DRIANCOURT et al., 1991; GINTHER et al., 1995). Aos dois eventos (recrutamento e seleção), que ocorrem na ocasião do surgimento do FSH, dá-se o

nome de onda folicular, porém esta denominação não é uma máxima no estudo do crescimento folicular em ovelhas.

Em ovelhas ocorrem cerca de três ondas foliculares, sendo duas na fase luteal e uma na fase folicular (NOEL et al., 1993), que emergem nos dias zero, seis e 11 do ciclo estral (RUBIANES, 2000). Sendo que, na fase lútea haverá o predomínio de progesterona, já na folicular o estrógeno será o hormônio esteroidal predominante, fato que não ocorre em primatas, onde as concentrações de estrógeno e progesterona mantêm-se sem muita diferença (BAIRD, 1983).

McNatty et al. (1999) propuseram que apenas folículos entre um e três mm (milímetros) estariam envolvidos no recrutamento, ou seja, responderiam ao FSH, porém Dufour *et al.* (1979) e Driancourt (1991) demonstraram uma maior variabilidade no diâmetro dos folículos recrutados, de dois a seis mm de tamanho. Na ocasião da seleção, os folículos destinados à ovulação adquirem receptores de LH nas células da granulosa, aumentando sua capacidade de síntese de estrógeno, havendo diminuição na secreção de FSH e regressão dos folículos menores. Caso ocorra uma baixa nos níveis de progesterona, pela regressão lútea, ou retirada de um implante exógeno, pode acontecer o desencadeamento da ovulação.

Driancourt e Cahill (1984) demonstraram uma diminuição no número de folículos 12 horas após aplicação de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), associando este fenômeno à existência de uma grande proporção de folículos atrésicos na fase lútea. Os autores também observaram que entre 48 a 54 horas após esta aplicação, o folículo selecionado já era observado e a ovulação ocorria cerca de 60 horas após a administração da $PGF_{2\alpha}$. Comportamento semelhante foi observado por Cahill (1981), que detectou a ocorrência da ovulação, próxima das 48 horas após a regressão luteal.

Com a dominância, o número de receptores de LH e a concentração plasmática de estrógeno crescem promovendo *feed-back* positivo para liberação do pico de LH, cerca de 24 horas após o aparecimento dos sinais do estro, e conseqüentemente, a ovulação (RUBIANES et al., 1997a). Neste momento além do aumento nas concentrações de LH até o alcance do pico, haverá elevação nas concentrações de inibina.

A taxa de ovulação é determinante da eficiência reprodutiva nos ovinos, variando de acordo com a raça, nutrição e fontes exógenas de hormônios gonadotróficos. Bartlewski et al. (1998) demonstraram que ovelhas com níveis de inibina mais baixos, apresentam um nível maior de prolificidade. O fato de haver crescimento de mais de um folículo, resultando em ovulação, prejudica o estudo do padrão do crescimento com técnicas menos invasivas (SCHRICK et al., 1993).

Quirke et al. (1981) observaram que alta população de folículos, provoca maior sensibilidade na interação do LH com estrógeno, levando a um maior número de folículos até a ovulação. Em experimentos comparando população folicular de duas raças e suas respectivas taxas de ovulações. Onde ovelhas *Romanov* eram as mais prolíficas e conseqüentemente as que possuíam uma maior população folicular, os autores justificaram a maior taxa ovulatória com uma maior quantidade de estrógeno e uma menor sensibilidade do *feed-back* negativo ao FSH, impedindo assim a regressão de um elevado número de folículos, conseqüentemente uma maior resposta ao LH (CAHILL et al., 1979).

Castoguy et al. (1990) não observaram efeito de folículos maiores suprimindo menores, por outro lado, concluíram que uma maior taxa de ovulação ocorria quando haviam um ou mais folículos disponíveis no momento do

recrutamento. Sendo que, a maioria dos folículos ovulatórios surge em momento que ainda há um corpo lúteo funcional.

2.2. Estudo dos eventos ovarianos

O estudo de todos os eventos, relacionados aos acontecimentos ovarianos nas ovelhas, enfrentam o gargalo da sua acessibilidade, fato que não ocorre na vaca, tampouco em éguas, animais onde o ovário pode ser palpado e colocado em contato direto com o transdutor.

Os primórdios do estudo do crescimento folicular, na ovelha, ocorreram através da necessidade do abate dos animais e colheita dos ovários (CAHILL, 1981), laparotomia, onde se procedia à mensuração do ovário *in situ* (QUIRKE et al., 1981) ou as fêmeas eram ovariectomizadas (CAHILL & MAULÉON, 1980), além da laparoscopia (BOYD & DUCKER, 1973; NOEL et al., 1993). Nestes experimentos, os autores faziam cortes histológicos para observação da população ovariana, seja de folículos pré-antrais, folículos pré-ovulatórios, além da contagem e mensuração de maneira macroscópica dos folículos antrais encontrados.

Na maioria dos estudos com ovelhas, os animais foram abatidos, em diferentes estágios do ciclo estral, para uma posterior análise e avaliação dos achados visando juntar os dados e obter, assim o padrão de crescimento folicular durante o ciclo estral completo (CAHILL & MAULÉON, 1980; DRIANCOURT et al., 1986).

Outra alternativa utilizada era a injeção de tinta nanquim nos folículos com menos de dois mm, para avaliação posterior e verificação do crescimento ou regressão (DRIANCOURT & CAHILL, 1984). Porém, a análise dos achados

ovarianos por meio dos cortes histológicos era muito difícil e esta dificuldade era contornada através do ranqueamento dos folículos em cinco classes, onde: Classe 01 os folículos possuíam 0,20-0,32mm; Classe 02 de 0,32-0,50mm; Classe 03 de 0,50-0,80mm; Classe 04 de 0,80-2,00mm; Classe 05 acima de 2 mm, onde já estariam em final de diferenciação para posterior crescimento até os estágios subsequentes (DRIANCOURT et al., 1986).

Oldham et al. (1976) para evidenciar a nocividade dos experimentos com laparotomia nas taxas de ovulação, compararam este método ao da laparoscopia proposto por Boyd e Ducker (1973), sendo observado que a laparotomia interferia significativamente nestas taxas, quando não haviam perdas no número de animais envolvidos no experimento.

2.3. A ultrassonografia no estudo ovariano

A popularização do método não invasivo da ultrassonografia modo B, na década de 90, possibilitou que os estudos dos eventos ovarianos fossem realizados com maior objetividade na ovelha (GINTHER et al., 1995; SCHRICK et al., 1993) e na cabra (GINTHER & KOT, 1994). Schrick et al. (1993) descreveram uma técnica com o animal em decúbito dorsal, sendo que foi comprovado posteriormente ser uma maneira melhor e mais tranquila para exame destas estruturas, uma vez que a ovelha é um animal de comportamento submisso, fácil manejo e contenção, a despeito do desconforto da posição. No entanto, este tipo de exame, não foi recomendado para realização a campo (VIÑOLES et al., 2004).

Viñoles et al. (2004) utilizando probe linear de 7,5 MHz com o animal em estação, obtiveram sucesso na observação de folículos maiores que quatro mm e

corpo lúteo, porém encontraram dificuldade na mensuração de mais de um corpo lúteo no mesmo ovário (Figuras 01 e 02).

O estudo do corpo lúteo através de exames ultrassonográficos não tem demonstrado ser confiável. Um exemplo é o estudo desenvolvido por Gonzales de Bulnes et al. (1999) em cabras tratadas com eCG que utilizaram a ultrassonografia apenas para observar o momento da ovulação, porém quando necessitaram observar corpos lúteos já formados e sua funcionalidade, estes autores lançaram mão da laparoscopia.

Observando a ocorrência de refratariedade à $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte do corpo lúteo de ovelhas *Corriedale* múltiparas, Rubianes et al. (2003) comprovaram, através da redução dos níveis plasmáticos de progesterona que estaria sendo secretada pelo corpo lúteo, e que a regressão desta estrutura ovariana, acontecia somente quando a $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi injetada a partir do terceiro dia pós ovulação.

Exames ultrassonográficos diários, utilizando probe de 5 Mhz, objetivaram apenas a observação do desaparecimento do folículo ovulatório. Segundo Dickie et al. (1999) a probe de 5Mhz é de menor confiabilidade ao tamanho real, uma vez que promove uma superestimação no tamanho real das estruturas ovarianas.

Schrick et al. (1993) detectaram corpos lúteos de ovelhas ao redor de quatro dias pós ovulação e esta estrutura muitas vezes apresentava cavidade (Figura 03), entretanto não foi possível relacionar as baixas concentrações de progesterona com a presença de CL cavitários pois na maioria dos casos havia a presença de CL proveniente de outra ovulação.

A ultrassonografia é tida como a redenção do estudo da dinâmica folicular em ovelhas, embora ocorra subestimação ou superestimação dos valores de folículos menores que três mm e do número de corpos lúteos, e da dificuldade de

identificação de toda a população de folículos com tamanho igual ou menor que 2mm (VIÑOLES et al., 2004).

As diferentes angulações a que o ovário é submetido, no momento do exame ultrassonográfico (US), dificultam sua realização, assim, para aumentar a acurácia dos exames são realizadas gravações de monitoramento dos ovários para avaliação posterior. Desta forma, além de reduzir erros nas mensurações realizadas, promove-se imparcialidade no exame do ovário, tendo em vista que a pessoa que fez as mensurações não será o operador do ultrassom (REYNA et al., 2007). Diagramas que servem como mapas dos ovários para localização das estruturas (Figuras 01 e 02) também são ferramentas facilitadoras ao estudo do padrão de crescimento folicular (CONTRERAS-SOLIS et al.; 2008; VIÑOLES et al., 2004).

Além da questão física, dificultando acesso ao ovário, há a relação entre a genética, a endocrinologia e o padrão de crescimento folicular (MONTGOMERY et al., 2001), fato este que provoca em alguns autores relutância em classificar o padrão de crescimento folicular como dinâmica em ovelhas (EVANS, 2003; SCHRICK et al., 1993). A maioria dos folículos que ovulam duplamente, provêm da mesma onda folicular, esta onda se origina pelo crescimento de um folículo proveniente de um grupo de folículos antrais. Estes folículos crescem cerca de cinco a sete dias com uma taxa de no máximo um mm por dia, atingindo um máximo de diâmetro com cerca de 5,5 mm. O tamanho atingido pelo folículo pré-ovulatório (FPO) difere entre as ondas, ou seja, não necessariamente o folículo pré-ovulatório terá o mesmo tamanho entre as diferentes ondas foliculares (MENCHACA & RUBIANES, 2004).

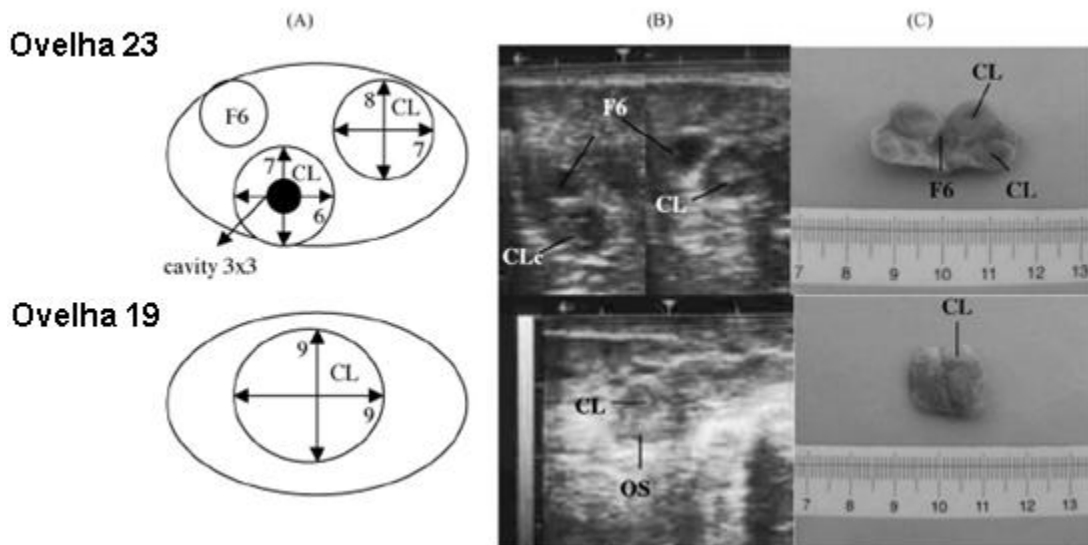


Figura 01. Representação de corpo lúteo (CL) funcional (ovelha 23) e não funcional (ovelha 19). O ovário da mesma ovelha é apresentado como: (A) Um mapa ovariano feito com base no monitoramento ultrassonográfico 12 horas antes do abate; (B) Fotografia da imagem ultrassonográfica do ovário *in vivo*; (C) Ovelha 23 com um ovário apresentando 2 CLs funcionais sendo que um apresentava uma pequena cavidade (3x2mm) e ovelha 19 um CL não funcional (6x6mm) que foi superestimado pelo exame ultrassonográfico (ver em (A)). Adaptado de VIÑOLES *et al.* (2004).

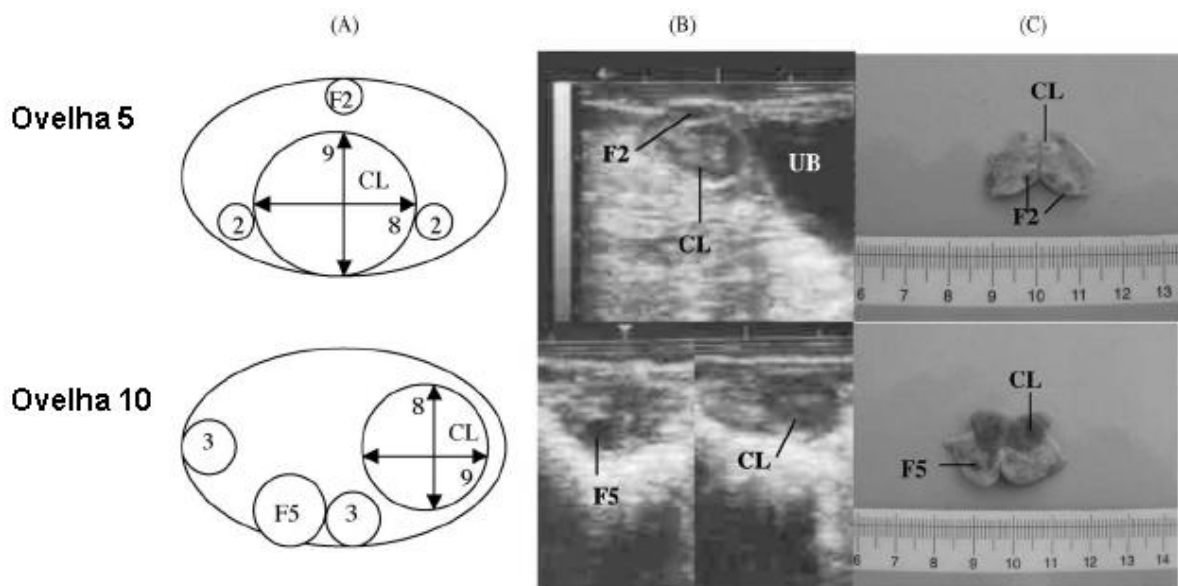


Figura 02. Representação de folículos com diferentes diâmetros e CL. A mesma estrutura de gráficos propostos na figura 01. Onde na ovelha 5 em (C) foi encontrado um CL não funcional (8x7mm), onde o tamanho da estrutura foi superestimado no exame ultrassonográfico (vê-se em (A)). Adaptado de VIÑOLES *et al.* (2004).

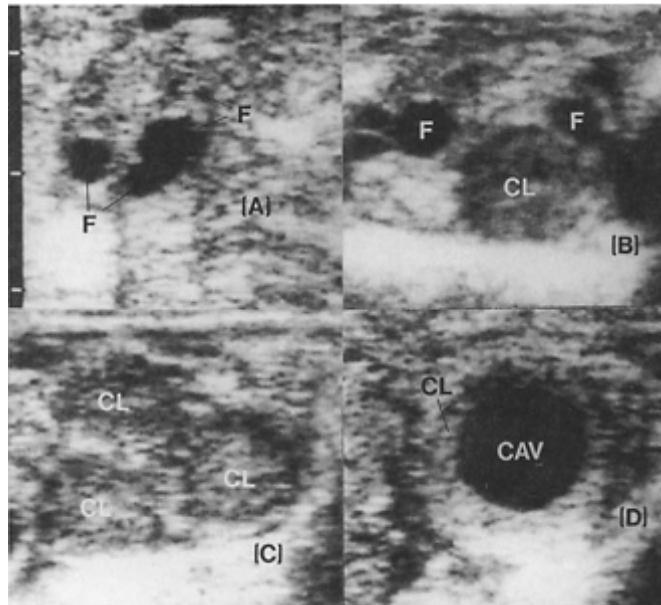


Figura 03. Imagem ultrassonográfica de folículos (F) e corpo lúteo (CL); Vê-se em (D) um CL cavitário. Adaptado de SCHRICK et al. (1993).

2.4. O Estradiol

O estradiol (E2) é um hormônio esteroidal de peso molecular alto, cerca de 376.000g/mol. Desta forma sua ação é exercida dentro da célula. A molécula penetra via bicamada lipídica da célula. Este hormônio tem sua origem na molécula do colesterol, onde é convertido em andrógenos nas células da teca, que por sua vez é convertido em estradiol-17 β pelo citocromo p450 das células da granulosa, possibilitando o surgimento e desenvolvimento do antro folicular.

O estradiol atua diretamente no sistema neuroendócrino promovendo uma elevação na liberação de GnRH, induzindo, conseqüentemente o pico do LH, ovulação e subseqüentemente a formação luteal (MOENTER et al., 1990), sendo

que esta ação por *feed-back* positivo induz a uma sensibilização da hipófise, aumentando sua responsividade ao GnRH (KAYNARD et al., 1988).

O estrógeno é necessário para manifestação do comportamento de estro, sendo hormônio indispensável na coordenação das mudanças endócrinas e comportamentais necessárias para o sucesso reprodutivo, porém há necessidades diferentes entre as concentrações necessárias para desencadear os sinais de estro e para as concentrações que promoverão o pico pré-ovulatório de LH (SAID et al., 2007).

O estradiol é amplamente utilizado na manipulação do ciclo estral em vacas, sendo na indução de uma nova onda, assim como da ovulação (BÓ et al., 1994; BÓ et al., 2002). Um único tratamento com estradiol em vacas com níveis elevados de progesterona circulante, induziu a uma diminuição nas concentrações de FSH e atresia folicular, com subsequente emergência de uma nova onda de crescimento folicular de três a cinco dias após, demonstrado que após este período a hipófise recuperou-se do *feed-back* negativo por parte do esteróide. Sob baixos níveis de progesterona, as vacas tratadas com reduzidas doses de estradiol responderam com pico de LH 18 a 24 após e posterior ovulação (BÓ et al., 2002).

Ao utilizarem o Estradiol 17 β , Meikle et al. (2001) não observaram aumento de resposta da hipófise em ovelhas pré-pubescentes e além de não obterem indução da ovulação. Os animais tratados apresentaram 10 a 14 horas uma elevação nos níveis de LH após a aplicação do E2, mas não mostraram habilidade na indução de ovulação, por outro lado, estes autores observaram redução do maior folículo, com a indução de emergência de uma nova onda folicular após aplicação e subsequente redução nas concentrações de FSH, achados semelhantes aos descritos por Bó et al. (1993) quando trataram vacas com valerato de estradiol.

O tratamento com estradiol em vacas induziu a emergência de uma nova onda em um período de três a cinco dias, este achado descrito por Bó et al. (1994), é atualmente utilizado em larga escala para manipular um ciclo estral em vacas.

Ovelhas com baixa prolificidade em algumas raças chegando a ser chamadas de animais monovulares, possuem um folículo que cresce mais do que folículo imediatamente menor, além disso, estes folículos secretam maior quantidade de estrógeno do que os outros folículos menores da mesma onda (EVANS et al., 2000).

O sítio de ação primário do estradiol em ovelhas, para que ocorra tanto a manifestação do estro quanto a indução do pico pré-ovulatório de LH é a porção médio-basal do hipotálamo (CARATY et al., 1998).

Evans et al. (1994) utilizando estradiol, observaram que uma dose contínua e elevada promoveu uma diminuição na amplitude e um aumento na frequência da secreção de GnRH, e que esta diminuição foi observada quando as concentrações de estradiol foram aumentando progressivamente da fase luteal até o ápice da fase folicular, fato que não ocorreu quando havia aumento rápido nas concentrações de estradiol. Além disto, quanto maior a dose de estradiol maior seria o decréscimo no pulso de GnRH. Porém houve uma dissociação temporária entre o feed-back negativo do estradiol sobre a hipófise e o hipotálamo (CARATY et al., 1989).

O estradiol foi altamente efetivo para inibir a secreção de GnRH em ovelhas que apresentavam-se em anestro (KARASCH et al., 1999), porém este efeito não está bem esclarecido, uma vez que outras interações esteróides-gonadotrofinas, assim como o estresse e a desnutrição podem estar envolvidas no processo (SCHENEIDER et al., 2006).

Raças de alta prolificidade necessitam de um maior período de submissão ao estradiol para que ocorram as manifestações de estro, geração do pico pré-ovulatório de LH e recrutamento de onda folicular. Nestas raças a manifestação de estro não depende das concentrações de LH (SAÏD et al., 2007).

Utilizando o benzoato de estradiol em ovelhas Sulffolk, Takada (2004) não observou sincronia no surgimento de onda folicular, tampouco a supressão do crescimento dos folículos. Neste experimento as doses de 0,1 a 0,3 mg não fizeram efeito positivo na supressão dos folículos ovarianos.

2.5. O GnRH

O GnRH é um decapeptídeo produzido em neurônios especializados do hipotálamo e liberado de maneira tônica e pulsátil, de forma que a ciclicidade reprodutiva está intrinsecamente ligada ao tipo de liberação deste hormônio. Nos ovinos, isto ocorre em período de redução da luminosidade, ou seja, em dias curtos, caracterizando-os como animais de fotoperíodo negativo.

O GnRH era inicialmente denominado hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) por acreditar-se que sua ação era exercida exclusivamente sobre a liberação do LH. Com estudos realizados no final da década de 60 e início da década de 70, sobre a sua interação entre a liberação e a sua retro-alimentação positiva exercida pelo estrógeno (GODING et al., 1969, SCARAMUZZI et al. 1970, REEVERS et al., 1974). Bolt et al. (1971) observaram que 20 horas após a administração de benzoato de estradiol em ovelhas cíclicas, ocorria um aumento significativo nas concentrações de LH, sendo este um dos trabalhos clássicos no estudo da interação estrógeno-hipotálamo.

Inicialmente estudos envolvendo este hormônio e sua utilização nas ovelhas, era realizado em diferentes momentos do ciclo estral, a contar do dia zero do início do estro. Administrava-se extratos contendo GnRH, em diferentes dias do ciclo, com observação da resposta ovariana por laparotomia, já que nesta época a avaliação por ultrassonografia estava longe da realidade. As respostas foram proporcionais às doses empregadas: 12,5µg e 100µg, sendo mais expressiva por volta do dia três quando comparado com o dia 12 do ciclo, neste dia, o momento em que há elevação do nível de LH, não induziu uma resposta ovulatória nas ovelhas tratadas (RIPPEL et al., 1974).

2.6. Potencialidade na utilização do GnRH

As ovelhas são animais poliéstricos estacionais de dias curtos, sendo que sua estação reprodutiva concentra-se nos meses de menor exposição à luz ao longo do ano (EVANS & MAXWELL, 1991), caracterizadas por um intervalo entre gerações muito curto (BICUDO et al., 2005). No entanto, isto não quer dizer que nos outros períodos não haja atividade ovariana. Noel et al. (1993), em estudo realizado ao longo do ano em ovelhas Suffolk monitoradas por laparoscopia, observaram desenvolvimento folicular, sem ocorrência da ovulação, na primavera e no verão.

O tratamento com GnRH pode levar a um efeito direto na maturação do oócito a ser ovulado, na fecundação, na embriogênese e implantação do embrião, nas taxas de ovulação, na maior secreção de progesterona por parte das células luteais e na formação de corpos lúteos acessórios (KHAN et al., 2003; CAM et al., 2004). O GnRH é amplamente utilizado na vaca para redução de perdas embrionárias precoce, podendo também ser aplicado na reprodução ovina, já que

nesta espécie as perdas embrionárias são um entrave que podem alcançar níveis que variam de 20 a 40% (BOLET et al., 1986). Em borregas, com primeiro estro induzido, estas perdas podem alcançar taxas de 63% (GORDON, 1997).

2.7. Condicionantes à ação do GnRH

A dopamina proveniente do núcleo arqueado, promove uma diminuição na pulsatilidade do GnRH. Este fenômeno ocorre nas estações de dias longos por influência direta da melatonina. Nesta etapa o estrógeno não influencia na pulsatilidade do GnRH, levando a crer que esta inibição ocorre, provavelmente, de forma pré-sináptica. O estrógeno, presente no núcleo pré-óptico, liga-se aos seus receptores e por mecanismos ainda não esclarecidos, porém é sabido, não age nas células dopaminérgicas ativadas do tipo A15, cujas células irão inibir a produção do GnRH na região médiobasal do hipotálamo. Portanto, o núcleo arqueado, também denominado de centro tônico de liberação do GnRH, irá produzir dopamina, que modulará a liberação do neuropeptídeo no sistema porta, que teria como objetivo chegar até a adenohipófise (THIERY et al., 2002).

Este hormônio apresenta uma grande importância na puberdade em pequenos ruminantes, porque se relaciona com a maturação do hipotálamo, levando a uma menor sensibilização no eixo hipotalâmico-hipofisário, possibilitando aumento na sua pulsatilidade. Este fato é importante para início da atividade cíclica na fêmea púbere e para maturação final dos folículos no momento de reinício da atividade reprodutiva após anestro. O GnRH depende da interação com a progesterona para que as fêmeas apresentem manifestações clínicas do estro (LLEWELYN et al., 1993). O aumento das concentrações de progesterona tem papel importante durante

a transição da estação reprodutiva, na maturação do folículo para primeira ovulação e na manifestação do primeiro estro da estação reprodutiva (BICUDO et al., 2003).

O GnRH é liberado na eminência média, para o sistema porta hipotálamo-hipofisário, que é responsável pelo seu transporte até a células gonadotróficas, presentes na hipófise anterior. Neste momento, ele promove sua principal função, que é modulação da secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), muito embora, já foram encontrados receptores em diversos outros tecidos, como endométrio e massas tumorais (KIM, 2006).

O modo de ação do GnRH é característico de hormônios peptídicos, ocorrendo ligação com receptores de membranas que irão ativar a fosfolipase C, aumentando a taxa de degradação do fosfatidilinositol bifosfato em diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP_3). Estes mediadores irão atuar como segundos mensageiros, onde o IP_3 promove um incremento nos valores intracitoplasmáticos de íons Ca^{2+} e o DAG promove a liberação periférica dos grânulos contendo FSH e LH. (FÉLIX & DA SILVA, 2006).

A liberação do GnRH obedece ao reflexo neuroendócrino, onde os neurônios hipotalâmicos do núcleo pré-óptico liberam GnRH de maneira pulsátil no líquido cerebrospinal do terceiro ventrículo, na eminência média. Por sua vez carreará até a circulação porta, levando diretamente ao lobo anterior da hipófise. Neste processo há influência de retroalimentação positiva e negativa a depender do estímulo ovariano (SENGER, 2003).

Uma grande quantidade de GnRH administrada de uma única vez, não interfere no pico de LH, uma vez que se faz necessário uma grande quantidade de GnRH para que ocorra a dessensibilização da hipófise, além da necessidade de uma continuidade do estímulo de GnRH. A ocorrência do pico de LH é de suma

importância para o início da vida reprodutiva das fêmeas (CRIGHTON & FOSTER, 1977). Desta forma, é necessário um aumento abrupto na pulsatilidade do GnRH para ocorrência da ovulação (BOWEN et al., 1998).

Para que aconteça sucesso nas funções neuroendócrinas nos animais cíclicos, há necessidade do pico pré-ovulatório do LH, como também é nítida a influência do hormônio estrógeno. Caraty et al. (2002) sustentaram a hipótese da interação entre o estrógeno e o GnRH para manifestação de estro.

Na observação de animais tratados com antagonistas de GnRH e estrógeno, não houve manifestação normal de atividade sexual. Contrariamente, o GnRH prolongou o comportamento de estro quando tratado juntamente com pequenas concentrações de estrógenos. O nível elevado de estrógeno isoladamente não desencadearia o estro. A partir do momento, que o GnRH sai de valores basais e aumenta sua pulsatilidade, o comportamento estral é evidenciado, juntamente com a queda dos valores de progesterona, atingindo o auge da sua manifestação (CUMMING et al., 1973; CARATY et al., 2002).

2.8. Análogos de GnRH (agonistas e antagonistas)

Atualmente existem cerca de 2000 análogos de sintéticos do GnRH, sendo classificados quanto a sua atividade biológica, considerando maior ou menor afinidade aos receptores, absorção e distribuição *in vivo*, maior resistência, degradação e eliminação (PADULA, 2005).

A síntese de agonistas é realizada principalmente com a substituição dos isômeros *l* por *d*. A substituição da 6-glicina por um resíduo de *d*-alanina aumenta em 350 a 400% a potência do GnRH, de forma que ao aumentar a sua

lipossolubilidade haverá um aumento da meia vida do análogo, prolongando sua ação (KARTER & RIVIER, 1986).

Os agonistas mais comumente empregados na reprodução ovina são a buserelina (MCNEILLY & FRASER, 1987; PICTON et al., 1990), a deslorelina (HUDSON et al., 1999), gonadorelina (TAKADA et al., 2003; LUTHER et al., 2007) e outros com menor utilização, como a lecirelina (BISCARDE et al., 2009) ou ovalbumina-LHRH-7 (GÖKDAL et al., 2009). Os agonistas do GnRH são usados com objetivos pró-fertilidade ou anti-fertilidade temporária (FRASER, 1982), ou seja, quando se deseja obter a regressão folicular para obtenção de um crescimento folicular uniforme, com folículos no mesmo estágio de desenvolvimento (PADULA & MACMILLAN, 2005).

A buserelina é utilizada para indução de ovulação (RUBIANES et al., 1997, KHAN et al., 2006), incremento de função luteal (CAM et al., 2004), assim como para promover a quiescência ovariana, diferindo das finalidades anteriores quanto à concentração, forma e frequência de administrações (MCNEILLY & FRASER, 1987; PICTON et al., 1990).

Os agonistas são as principais alternativas para a melhoria na uniformidade de resposta ovariana a protocolos de superovulação, onde se pretenda iniciar o protocolo após uma fase de quiescência ovariana, momento em que todos os folículos crescerão de forma similar e livres da excessiva retroalimentação negativa de estrógeno (MCNEILLY & FRASER, 1987, COGNIÉ, 1999).

Os análogos com ligações fortes aos seus receptores e lentas taxas de degradação, a exemplo da deslorelina, geraram infertilidade em cadelas, por levar à síndrome de hiperestimulação ovariana (GOBELLO, 2007).

A deslorelina (etilamida-GnRH) é o análogo sintético de maior potência (COY & SCHALLY, 1978), com atividade relativa cerca de 150 vezes ao do GnRH, sendo mais utilizado com o propósito de promover a quiescência folicular, quando utilizado sob as formas de implante, injeções com veículo de absorção lenta ou repetidas aplicações (GOBELLO, 2007).

Gügör et al. (2007) utilizando a deslorelina, obtiveram em ovelhas, uma supressão reversível da atividade reprodutiva, com atraso da ciclicidade na estação reprodutiva subsequente e sem aumento nas concentrações de progesterona no primeiro ciclo pós-tratamento.

Os antagonistas de GnRH passaram a ser utilizados posteriormente, dentre eles o acetato de cetorelix e o acetato de ganirelix, devido ao antagonismo competitivo nos receptores de GnRH na hipófise, promovendo um efeito imediato e rápido na supressão das gonadotrofinas. Por não causarem hiperestimulação no período inicial de tratamento, constituem-se em alternativa aos usos de agonistas de GnRH (MURBER et al., 2009).

As características desejáveis para um antagonista residem na dose requerida para inibir a ovulação (HAHN et al., 1984), numa baixa habilidade histamínica e resistência a degradação enzimática (KARTER & RIVIER, 1986), características não encontradas nos antagonistas de primeira geração (VICKERY et al., 1989).

Um antagonista de GnRH de terceira geração, a Acilina, promoveu interrupção gestacional em cadelas com apenas uma aplicação, confirmando que a função luteal na cadela no terço médio de gestação tem a necessidade da presença de LH (VALIENTE et al. 2009).

Ao utilizarem o antagonista Antarelix, por 10 dias no período prévio à superovulação em ovelhas com gene Booroola *Fec*, Duffour et al. (2000) observaram uma melhor resposta superovulatória. Este antagonista além de promover redução nas concentrações de FSH e LH, reduziu o número de folículos com mais de dois mm, no início do tratamento superovulatório.

O tratamento com antagonista para a supressão do crescimento folicular, a exemplo do Antarelix, geralmente é mais curto do que com os agonistas, que requerem um período de cerca de 20 dias para promoverem o mesmo efeito (CONN & CROWLEY JR., 1994).

2.9. Momento de administração do GnRH, a ovulação e a função luteal

Türk et al. (2008) em protocolo de 12 dias com pessário vaginal de progesterona e duas inseminações 12 e 24 horas após início do estro, observaram uma maior taxa de nascimentos duplos para grupo tratado com GnRH, sugerindo uma maior taxa de ovulação. Neste trabalho realizado com ovelhas Awassi, ocorreu superioridade numérica na taxa de gestação e na prenhez gemelar, além de um número maior de nascimentos de fêmeas para o grupo tratado com GnRH no final do protocolo.

Beck et al. (1996) utilizando a buserelina, observaram um aumento nas concentrações de progesterona, quando administrada 12 dias após a ovulação.

Utilizando buserelina no momento da inserção da esponja, foi observada uma prolificidade de 1,84 e um incremento nos nascimentos múltiplos, além de superioridade numérica na taxa de fertilidade comparado aos demais grupos. A utilização desta estratégia, associada ao protocolo de curta duração promoveu o

recrutamento de folículos novos, reduzindo a problemática de ovulação de folículos quiescentes (KARACA et al., 2009).

Comparando o uso da buserelina com a deslorelina utilizada para indução de ovulação na segunda aplicação do protocolo Ovsynch[®] em vacas leiteiras, Ambrose et al. (1998), obtiveram uma menor taxa de produção de progesterona, com a última substância. Esta mesma deslorelina foi testada na forma de implante, 16 a 18 horas após IATF, causando uma baixa na taxa de fertilidade dos animais que utilizaram o implante de 750µg, levando a uma infertilidade transitória (SANTOS et al., 2004).

Em estudo com ovelhas Santa Inês observou-se maior atividade secretória de progesterona por parte do CL de animais que receberam a lecirelina. Observou-se níveis maiores de progesterona nas ovelhas tratadas com Lecirelina 30 horas após a retirada da MAP quando comparadas às fêmeas tratadas com benzoato de estradiol (BE) no início do protocolo. Este grupo ainda apresentou valores, superiores apenas numericamente aos grupos restantes (BISCARDE et al., 2009).

Quando ovelhas em anestro foram tratadas com GnRH, apresentavam uma resposta dúbia. Uma proporção de folículos pré-ovulatórios que não chegaram a ovular, continuaram o seu crescimento até a formação de cistos foliculares e cistos luteinizados, levando a formação de corpos lúteos de vida curta ou não funcionais (BARTLEWSKI et al., 2001; BARTLEWSKI et al. 2004).

Liu et al. (2007) em experimento utilizando GnRH em ovelhas em anestro e usando a ultrassonografia, observaram as características das imagens ultrassonográficas dos folículos pré-ovulatórios nesses animais. Vinte e seis das 34 ovelhas estudadas ovularam após a administração do GnRH, sendo formados 42 corpos lúteos, dos quais 22 tinham ecotextura normal e 20 possuíam ecotextura

inadequada. Foram realizadas avaliações pela análise computadorizada da imagem congelada. Os corpos lúteos com ecotextura inadequada foram provenientes de folículos que apresentaram, 24 horas antes da ovulação, maior intensidade em pixel de imagem do antro folicular, quando comparados aos folículos normais. Estes achados levaram os autores a inferir, que o destacamento das células da granulosa foi maior em folículos que deram origem a corpos lúteos de baixa qualidade funcional. Quanto ao desenvolvimento dos folículos no momento pré-ovulatório, apenas os folículos que deram origem às estruturas anovulatórias apresentaram taxa de crescimento maior do que os demais.

Dias et al. (2009) não observaram incremento nas taxas de gestação com a utilização do hCG no momento da inovulação de embriões em ovelhas mestiças de Santa Inês. O hCG possui em sua composição, uma proporção de cerca de 75% de LH e 25% de FSH, ação muito similar ao GnRH quando utilizado para indução das ovulações, apresentando efeito direto na liberação do pico pré-ovulatório de LH.

Khan et al. (2007), administraram hCG 12 dias após a inseminação artificial de ovelhas, observaram que os animais submetidos a esse tratamento apresentaram um incremento no tamanho do feto e dos placentônios. Este resultado foi visto com maior nitidez em fêmeas adultas do que em borregas. Os autores consideram que as concentrações de progesterona foram maiores neste estudo, corroborando os achados de Beck et al. (1996). A concentração de progesterona foi um dos fatores que mais influenciou na sobrevivência e no crescimento embrionário (WILMUT et al., 1985).

Utilizando 100µg de GnRH nos dias dois e três após o estro, Whitmore et al. (1996) observaram um aumento nas concentrações de LH cerca de 60 minutos após a sua administração, porém, talvez este não seja o momento ideal para a

utilização deste hormônio. A concentração de progesterona não diferiu em relação aos outros grupos, não influenciando na indução da ovulação, tampouco na formação de corpos lúteos acessórios e nem no incremento da função luteal.

Protocolos de sincronização de estro associando o GnRH e a prostaglandina mostraram-se eficazes na indução de ovulação e formação de corpos lúteos funcionais, isto quando a aplicação de prostaglandina é realizada na fase luteal inicial. Quando realizados na fase luteal tardia, há regressão precoce dos corpos lúteos formados após a ovulação subsequente (KEISLER & KEISLER, 1989; RAHAMANIAN & MURDOCH, 1989).

Rubianes et al., (1997) não encontraram diminuição nas concentrações de progesterona em ovelhas tratadas com GnRH na fase luteal tardia. Estes autores encontraram uma diminuição nas taxas de ovulação e nas manifestações de estro, colocando em reavaliação os achados propostos por Caraty et al. (2002). Neste estudo acima citado, os autores observaram o pico de LH cerca de duas horas após a administração do GnRH, a qual foi realizada 36 horas após a aplicação de prostaglandina. As ovulações ocorreram em até 48 horas após. Apenas uma ovelha das que possuíam corpo lúteo recente, não ovulou, isto provavelmente devido ao fato de apresentar altas concentrações de progesterona, um dia antes da aplicação do GnRH, levando ao crescimento do seu folículo até cerca de 11 mm. No grupo de ovelhas com o corpo lúteo velho, duas não apresentaram ovulação, porém os folículos se luteinizaram, aumentando as concentrações de progesterona cerca de cinco dias após a sua aplicação, levando a crer que a capacidade de ovulação dos folículos é maior quando há presença de folículos mais jovens (RUBIANES et al., 1997; KARACA, et al., 2002).

Os achados experimentais envolvendo estudos com benefícios da utilização deste hormônio e suas interações neuroendócrinas, esbarram em ensaios a campo, como proposto por Luther et al. (2007). Estes autores utilizaram 165 ovelhas, que foram inseminadas por laparoscopia, 36 horas após a retirada da fonte exógena de progesterona. Não foi observado incremento nas taxas de gestação dos grupos que utilizaram o agonista de GnRH, gonadorelina, associado ao eCG, havendo o agravante de quando o GnRH foi utilizado isoladamente, houve uma diminuição na apresentação do estro.

CAPÍTULO II

Artigo encaminhado à Revista Ciência Rural

ISSN 0103-8478

Função lútea e fertilidade em protocolo de curta duração associado ao benzoato de estradiol e/ou lecorelina em ovelhas Santa Inês

Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Sony Dimas Bicudo, Letícia Ferrari Crocomo, Luís Carlos Oña Magalhães, Rodrigo Freitas Bittencourt, Danilo Otávio Laurenti Ferreira, Cláudia Dias Monteiro, Eunice Oba.

RESUMO

O máximo do potencial reprodutivo deve ser buscado para incremento nas taxas de gestação, e conseqüentemente dos índices de melhoramento genético. A sincronização de estro surge como a biotecnologia a ser utilizada para este incremento, associando-a com a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Neste trabalho foram realizados dois experimentos. No experimento I (EI) utilizou-se 24 ovelhas divididas em quatro protocolos de curta duração, cada um com seis animais, sendo o grupo Controle (GC-EI), o grupo BE-1mg (BE-EI), o grupo GnRH-25µg (GnRH-EI) e o grupo BE-GnRH (BE-GnRH-EI) com a observação dos atributos ultrassonográficos tanto dos folículos quanto dos corpos lúteos. No experimento II (EII), 72 ovelhas foram divididas em dois grupos. O grupo 1 (G1-EII – n=30) recebeu o mesmo tratamento do grupo GnRH do experimento I, no grupo 2 (G2-EII – n=42) fêmeas foram submetidas a protocolo longo com 12 dias de progesterona e eCG no momento de retirada do pessário vaginal. Neste experimento foi realizada IATF via transcervical 52 horas após término do tratamento com progesterona. No experimento I a média de ovulações por ovelha foi de 1,6. Ocorreram um total de 37 ovulações, sendo 20 (54%) no ovário esquerdo (OE) e 17 (46%) no ovário direito (OD). Esses percentuais não diferiram significativamente ($P>0,05$). Nos tempos de ovulação, os animais apresentaram uma mediana de 68; 80; 52 e 71,2 horas para os GC-EI, BE-EI, GnRH-EI e BE-GnRH-EI, respectivamente, sem ocorrência de diferença significativa ($P>0,05$). Não houve correlação entre o tamanho do maior FPO e a dosagem de progesterona, porém quando se levou em consideração estas dosagens de progesterona e o número de ovulações, observou-se correlação, da mesma forma observou-se correlação entre as dosagens de progesterona e o número de ovulações ($r=0,616$; $P<0,01$). Nas dosagens de progesterona, o grupo tratado com GnRH apresentou valor maior ($P=0,017$) comparado ao grupo tratado com BE, porém quando comparada aos grupos restantes, não foi constatada diferença. A taxa de gestação foi de 46,6% e 28,6% para os grupos G1-EII e G2-EII, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre os respectivos grupos ($P>0,05$). Não houve efeito benéfico da utilização do GnRH sobre nenhum dos parâmetros estudados, entretanto a utilização do BE no início do tratamento, promoveu uma maior dispersão das ovulações, assim como um prejuízo na função luteal das ovelhas, refletindo nas menores concentrações plasmáticas de progesterona. Deve-se realizar mais estudos a respeito da utilização do GnRH como indutor de ovulação, como fator luteotrófico e seus reais benefícios acerca das taxas de gestações.

Palavras chave: Ovelhas, sincronização de estro, ultrassom

Luteal function and fertility in short-time protocol associated with estradiol benzoate and/or leirelin in Santa Ines ewes.**Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Sony Dimas Bicudo, Letícia Ferrari Crocomo, Luis Carlos Oña Magalhães, Rodrigo Freitas Bittencourt, Danilo Otávio Laurenti Ferreira, Cláudia Dias Monteiro, Eunice Oba.****ABSTRACT**

The maximum reproductive potential should be targeted in order to improve pregnancy rates and thus increase genetic improvement rates. With a view to achieving such potential, comes the estrus synchronization associated with the Fixed-time Artificial Insemination (FTAI). Two experiments were performed in this study. Experiment I (EI) used four short-time protocols, with 6 animals each and named as follow: control group (CGEI), estradiol benzoate (EB) group (EB-EI), GnRH group (GnRH-EI) and EB-GnRH group (EB-GnRH-EI). All of them passed through follicle and corpus luteum ultrasound examination. For experiment II, it was used 72 ewes divided into 2 groups. Group 1 (G1EII, n = 30) received the same treatment of G3EI from experiment I. In Group 2 (G2EII, n=42), ewes were subjected to a long-time protocol with 12 days of progesterone and eCG at the end of treatment. In this experiment it was performed transcervical FTAI 52 hours after the end of progesterone treatment. Experiment I had 1.6 as ovulation average/ewe. There were 37 ovulations altogether, being 20 (54%) from the left ovary (LO) and 17 (46%) from the right ovary (RO), with no significant difference ($P>0.05$). As for the ovulation time, median was 68; 80; 52 e 71,2 hours for groups CG-EI, EB-EI, GnRH-EI e EB-GnRH-EI, respectively, with no significant difference ($P>0,05$). There had been no correlation between the biggest preovulatory follicle (POF) and the progesterone level. However, there was correlation between progesterone level and number of ovulations ($r=0.616$; $P<0.01$). As for the progesterone level the GnRH group presented higher vaues ($P=0,017$) when compared to group with estradiol benzoate, but when compared to the other groups there was no significant difference. In the experiment II, pregnancy rates were 46.6% and 28.6% for groups G1 and G2, respectively with no significant difference ($P>0.05$). Nevertheless further studies shall be performed with regard to the use of GnRH as ovulation inducer and luteotropic factor, and its benefits towards the pregnancy rates.

Keywords: Ewes, estrus synchronization, ultrasound

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade de elevado potencial na produção animal, isto se deve à capacidade reprodutiva desta espécie, que apresenta intervalo entre gerações menores quando comparados aos equinos e bovinos, facilitando os programas de melhoramento genético. Para que se obtenha uma eficiência econômica adequada, deve-se buscar o máximo do potencial reprodutivo, sendo a sincronização de estro, uma biotecnologia de incremento nos índices reprodutivos, atuando na quebra de estacionalidade reprodutiva, possibilitando a utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e podendo alcançar índices de três partos a cada dois anos (BICUDO, 2006).

O conhecimento da fisiologia do ciclo estral e a influência de sua manipulação na função luteal, são necessários para um perfeito entendimento de como e quando interferir nos eventos relacionados, para conseguir os melhores resultados. Em protocolos de longa duração relata-se que no fim do tratamento com progestágenos, os valores séricos de progesterona chegam a índices abaixo de 1ng/mL, considerados subluteais (VIÑOLES et al., 1999). Estas concentrações subluteais, no final do protocolo, estão associadas com anormalidades no desenvolvimento folicular e na função luteal, além da diminuição nas ovulações e na fertilidade (LEYVA et al., 1998; UNGERFELD & RUBIANES, 1999; EVANS et al., 2001).

A avaliação da função ovariana foi por muito tempo realizada através de procedimentos invasivos, como a laparotomia (QUIRKE et al., 1981) e laparoscopia (OLDHAM & LINDSAY, 1980). Com a popularização da ultrassonografia na medicina

veterinária, obteve-se avanço nas observações dos corpos lúteos em ovelhas (SCHRICK et al., 1993).

A imagem ultrassonográfica modo B consiste da diferença na densidade dos tecidos, refletindo diferentemente, as ondas de elevadas frequências emitidas por elementos piezoelétricos provenientes do transdutor, que transformam energia elétrica em mecânica. As imagens são apresentadas na escala de cinza do tipo bidimensional com diferentes números de pixel (pontos), onde os tecidos podem refletir de 0 a 256 tipos de pontos na escala de cinza, sendo o zero negro e o 256 o branco (McDICKEN, 1991).

Singh et al.(1997) trabalhando com novilhas, tentaram correlacionar imagens ultrassonográficas do corpo lúteo (CL) e a concentração plasmática de progesterona e concluíram que somente após análises através de métodos computadorizados, foi possível detectar que haviam indícios de correlação.

Dentre os hormônios relacionados para manipulação do ciclo estral, pode-se citar o GnRH e o benzoato de estradiol (BE), ambos amplamente utilizado na sincronização de onda folicular e indução da ovulação em bovinos (PURSLEY et al., 1995; BÓ et al., 2002), além de utilizado pós ovulação em vacas e búfalas (CAMPANILLE et al., 2007), sendo o GnRH com finalidade luteotrófica, para promoção da luteinização de folículos e/ou formação de corpos lúteos acessórios, incrementando as concentrações de progesterona. Não se sabe ao certo, o seu efeito na função luteal das ovelhas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar interferência da utilização do GnRH, como agente indutor de ovulações e na função luteal de ovelhas. Como objetivos secundários, a observação da sua influência em associação ou não ao benzoato de estradiol na taxa e no tempo de ovulação, nas características do estro e no tamanho

do folículo ovulatório e suas correlações com a área do corpo lúteo e desta com os níveis plasmáticos de progesterona, avaliados no quarto dia após a ovulação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Experimento I

2.1.1 Animais e local do experimento

O estudo foi realizado nos meses de dezembro e janeiro, no laboratório de estudos em biotecnologia aplicada a reprodução em caprinos e ovinos da FMVZ – UNESP, Botucatu-SP, localizado à 22°53'09" sul e 48°26'42" oeste, a 804 metros de altitude. Vinte e quatro ovelhas da raça Santa Inês, apresentando escore corporal acima de 3 (1 a 5), com idade entre 12 e 18 meses, alimentadas diariamente com 600g de concentrado, feno e água *ad libitum*, foram divididas em quatro grupos experimentais. A ciclicidade de todos os animais foi comprovada através da dosagem plasmática de progesterona pareada em intervalo de sete dias, as quais apresentaram em pelo menos uma das dosagens, concentrações acima de 1 ng/mL.

2.1.2 Tratamento hormonal

Os animais do grupo Controle (GC-EI - n=06) receberam uma aplicação de 45 µg *d*-cloprostenol (Prolise®-Tecnopec) no dia zero, colocação da esponja impregnada com 60 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP60®-Tecnopec) no dia três, retirada da esponja aplicação de 400UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 45 µg *d*-cloprostenol no dia sete. As ovelhas do grupo BE (BE-EI – n=06) receberam o mesmo tratamento do GC-EI, adicionando-se 1 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia 1. O grupo GnRH (GnRH-EI – n=06) recebeu o mesmo

tratamento do GC-EI com a aplicação de 25µg de lecirelina (Gestran plus® - Tecnopec), análogo do GnRH, 30 horas após a retirada da esponja. Por fim, os animais do grupo BE-GnRH (BE-GnRH-EI – n=06) receberam o mesmo tratamento do grupo BE-EI adicionando aplicação de 25µg de lecirelina 30 horas após a retirada da esponja. As duplas aplicações de d-cloprostenol estão associadas ao modelo teórico de crescimento folicular e ovulação proposto por Menchaca e Rubianes (2004).

2.1.3 Exame ultrassonográfico

Utilizou-se um aparelho da marca Aloka® SSD-500 aparelhado com transdutor linear prostático de frequência 7,5 MHz (Modelo UST-660-7,5), testado para estudo em ovinos por Schrick et al. (1993) e observada possíveis troca de lado entre as estruturas por Bicudo et al. (2009) quando estes autores utilizaram implantes metálicos diferenciados entre os ovários. Antes da execução do exame, a ampola retal era esvaziada e introduziu-se mucilagem (solução aquosa de carboximetilcelulose) até o seu preenchimento completo, a fim de proporcionar o contato da probe com a mucosa retal, facilitando na assim o exame. O exame ultrassonográfico dos ovários foi realizado com as fêmeas em estação a cada 8 horas, às 7:00; 15:00; 23:00, antes da colocação do pessário vaginal com MAP (Momento PRÉ-MAP), ou seja, do dia zero até o dia três. No momento da inserção da esponja, os exames passaram a ser realizados a cada 12 horas, momento MAP. Retornando a frequência dos exames a cada 8 horas após a retirada das esponjas (momento PÓS-MAP), continuando até o desaparecimento do folículo pré-ovulatório (FPO), este momento foi considerado o momento ovulatório, sendo confirmado seu

desaparecimento, no exame subsequente. A localização dos corpos lúteos (CL), como estrutura isogênica em relação ao estroma ovariano (SCHRICK et al., 1993) foi constatada no quarto dia após o desaparecimento do FPO, seguida pela execução da mensuração de sua área, realizada por duas formas disponíveis no equipamento, área em elipse (ACLE) e área traço (ACLT), nesta última percorre-se a delimitação do CL (Figura 01). Caso houvesse a presença de dois CLs, suas áreas eram somadas.

2.1.4 Observação do estro

A manifestação dos sinais do estro foi observada a cada 8 horas após a retirada da esponja, após a execução dos exames ultrassonográficos. Era executado por reprodutor com a libido devidamente comprovada durante 30 minutos, portando uma manta amarrada no abdômen protegendo o prepúcio, evitando a penetração peniana.

2.1.5 Colheita de sangue e dosagem hormonal

No quarto dia após a ovulação executou-se a colheita das amostras de sangue por venopunção jugular, em tubos a vácuo heparinizados, mantidos sob refrigeração até a centrifugação (1200xg/10 minutos) com separação do plasma. O plasma foi mantido congelado até o momento da quantificação hormonal. As dosagens plasmáticas de progesterona foram realizadas no laboratório de Endocrinologia do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária através de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se kits comerciais de elevada

especificidade para progesterona em fase sólida (DPC - diagnostic products corporation, Los Angeles - Med Lab) e contador gama automatizado (Vitek, modelo Kinet Count 48, USA) que forneceram valores em ng/mL. Os valores de progesterona iguais ou superiores a 1 ng/mL, em pelo menos uma das quantificações foram considerados indicativo de atividade luteal.

2.2 Experimento II

2.2.1 Animais e local do experimento

O estudo foi realizado na propriedade da Embrapa Tabuleiros Costeiro, localizada no município de Frei Paulo – SE, situado a 10°32'56" Sul e 37°32'02", nos meses de abril e maio. Utilizou-se 72 animais da raça Santa Inês, multíparas e nulíparas, divididas de forma aleatória, mantidos a pasto e sem ciclicidade comprovada.

2.2.2 Tratamento hormonal

As 72 ovelhas foram divididas em dois grupos. O grupo 1 (G1-EII; n=30) recebeu o mesmo tratamento do grupo GnRH do experimento I: uma aplicação intramuscular (IM) de 45 µg *d*-cloprostenol (Prolise®-Tecnopec) no dia zero, seguido da colocação de esponjas impregnadas com 60 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP60®-Tecnopec) no dia três e posterior retirada das esponjas e administração IM de 400UI de eCG e 45 µg *d*-cloprostenol (Prolise®-Tecnopec) no dia sete. Trinta horas após a retirada da esponja administrou-se de 25µg de

lecorelina (Gestran plus[®] - Tecnopec). No grupo 2 (G2EII; n=42) foram utilizadas 42 fêmeas e submetidas a protocolo longo com 12 dias de pessário vaginal impregnado com acetato de medroxiprogesterona, no momento da retirada do pessário foi administrado 400 UI de eCG via IM.

2.2.3 Inseminação artificial

As ovelhas foram inseminadas entre 52 e 56 horas após a retirada do implante de progesterona pela via cervical com sêmen congelado em diluidor a base de TRIS-GEMA, possuindo concentração de 100×10^6 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva. Neste momento, fazia-se a tração cervical com auxílio de pinça para colo de útero do tipo Pozzi. Procedia-se a colocação da pipeta na cérvix e era depositado o sêmen até a máxima profundidade que se conseguia.

2.2.4 Colheita de sangue e dosagem hormonal

37 ovelhas foram escolhidas aleatoriamente entre os dois grupos, sendo 19 do G1EII e 18 do G2EII, nas quais no quarto dia após a inseminação, executou-se a colheita das amostras de sangue colhidas por venopunção jugular, em tubos a vácuo heparinizados, mantidos sob refrigeração até a centrifugação (1200xg/10 minutos) com separação do plasma. O plasma foi mantido congelado até o momento da quantificação hormonal. A dosagem de progesterona foi realizada conforme o descrito no experimento I.

2.2.5 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a inseminação, através de ultrassonografia em tempo real *B-mode* via trans-retal.

2.2.6 Análise estatística para ambos os experimentos

A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico SAS[®] (v.5, 1996), sendo realizado teste de normalidade das amostras, para as características que a normalidade falhou, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis (One Way Analysis of Variance on Ranks). Para as características de tempo de ovulação, início de estro, tempo de estro em relação a ocorrência de ovulação (Estro-Ovulação) e o número de ovulação, foi feita a análise com base na mediana dos grupos. Já para as características que a normalidade não falhou foi realizado o teste F para análise de variância e o teste de Tukey para comparação entre médias.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento I

As 24 ovelhas obtiveram ganho de peso no final do experimento, sendo que também apresentaram, nas colheitas pareadas em intervalo de sete dias, pelo menos uma dosagem de progesterona acima de 1 ng/mL.

Todos os CLs foram encontrados quatro dias após a ovulação, porém quando havia ovulações duplas no mesmo ovário, encontrava-se dificuldade na delimitação das estruturas, mas sem comprometimento do exame. Este fato ocorreu em quatro ovelhas.

Cinco CLs apresentavam-se cavitários, representando 13,5%. Nestes casos promovia-se a diminuição da área da cavidade pela área do CL total.

Apenas uma ovelha não ovulou, a qual pertencia ao grupo BE+GnRH, sendo excluída do experimento. Neste animal foi realizada a colheita de sangue para dosagem de progesterona seguindo como parâmetro, a última das ovulações, que ocorreu 156 horas após a retirada da MAP, registrada por uma ovelha pertencente ao grupo BE. Ao ser dosado, a amostra de progesterona plasmática deste animal, os valores apresentaram-se menores do que 1ng/mL, confirmando a sua não ovulação.

Ocorreram um total de 37 ovulações, com uma média de 1,6 por ovelha. Destas, 20 (54%) foram no ovário esquerdo (OE) e 17 (46%) no ovário direito (OD) ($P>0,05$).

Em relação ao tempo de ocorrência das ovulações após a retirada das esponjas os animais apresentaram a mediana de 68; 80; 52 e 71,2 horas para os grupos GC-EI, BE-EI, GnRH-EI e BE-GnRH-EI, respectivamente, sem ocorrência de

diferença significativa ($P>0,05$), porém houve uma grande dependência entre o protocolo utilizado e o momento ovulatório (Tabela. 01). Não houve diferença entre as medianas do tempo de início de estro e relação entre estro e tempo de ovulação ($P>0,05$) (Tabela 02).

A mensuração de CL foi realizada pelo menos três vezes para cada estrutura, sendo considerada a maior área, obtendo-se valores sem diferença significativa ($P>0,05$) quando comparadas entre os diferentes grupos (Tabela 03). Nestas mensurações de CL foi observada correlação entre as áreas de corpo lúteo traço (ACLT) e as áreas de corpo lúteo elipse (ACLE), com coeficiente de correlação ($r=0,984$), entre as áreas CL total traço e áreas CL total elipse ($r=0,956$) e entre a área CL total traço e as dosagens de progesterona ($r=0,643$), todos estes achados com $P<0,01$.

Em relação às dosagens de progesterona, o grupo GnRH-EI apresentou valor significativamente maior ($P=0,017$) quando comparado ao grupo BE-EI. Já quando foi comparada aos grupos restantes, a mesma diferença não foi constatada (Tabela 04).

O tamanho do maior FPO não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) entre os grupos. A correlação entre o tamanho do maior FPO ($r=0,174$) e a dosagem de progesterona, não foi significativa ($P=0,416$), porém quando correlacionou-se estas dosagens de progesterona e o número de ovulações observou-se correlação ($r=0,616$; $P<0,01$). De forma que o grupo GnRH-EI apresentou um número de ovulações maior do que os demais grupos.

3.2. Experimento II

Neste experimento, a taxa de gestação dos diferentes grupos foi de 46,6% e 28,6% para os grupos G1EII e G2EII, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$).

No momento da retirada do pessário de progesterona e concomitante a identificação do estro dos animais, foi observada uma mudança climática brusca, o que comprometeu a manifestação do estro por parte das fêmeas. Desta forma abandonou-se este parâmetro para análise do experimento, devido à queda nestes índices.

As dosagens de progesterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$). Para o grupo 1 (G1-EII), obteve-se níveis plasmáticos de 1,4ng/mL enquanto que para o grupo 2 (G2-EII), esses níveis alcançaram o valor de 1,3 ng/mL.

4. DISCUSSÃO

A presença de ciclicidade nos animais do experimento I, mesmo fora da estação reprodutiva, demonstra que as raças naturalizadas brasileiras exibem atividade reprodutiva durante o ano todo, independente da duração dos dias, possuindo maior relação quanto ao aporte nutricional (BICUDO et al., 2005).

A dosagem de progesterona não apresentou montantes similares quando se compara o mesmo grupo GnRH dentre os diferentes experimentos, no experimento I este grupo apresentou concentração das ovulações nas 52 horas e concentrações plasmáticas de progesterona elevadas. O fator de diferença entre os mesmos grupos, porém em experimentos diferentes, provavelmente se devem às diferenças entre populações e clima.

A incidência de duplas ovulações foi de 34,8%, percentual inferior ao de ovelhas da raça iraniana Sajabi com 40,2% das ovulações duplas (SHABANKAREH et al., 2009), estes autores obtiveram uma diferença entre as ovulações do lado direito e esquerdo, onde este último demonstrou menor número de ovulações. Triplas ovulações ocorreram em 13% dos eventos. Os animais que apresentaram ovulações múltiplas não apresentaram dosagens de progesterona maiores do que àqueles que possuíam ovulação única. Da mesma forma, Araújo et al. (2007) não obtiveram incremento na taxa de gestação em receptoras de embriões com duplas ovulações. Por outro lado Türk et al. (2008) em protocolo de 12 dias com pessário de progesterona e duas inseminações 12 e 24 horas após início do estro, observaram uma maior taxa de nascimentos duplos para o grupo tratado com GnRH, sugerindo uma maior taxa de ovulação.

Nesse experimento, todos os CLs foram identificados no momento do exame ultrassonográfico. Esse percentual de identificação é similar ao descrito por Viñoles et al. (2004) e superior àqueles de Schrick et al. (1993), Duggavathi et al. (2003) e Ślośarz et al. (2004), que obtiveram 80%, 96% e 94%, respectivamente.

Utilizando probe de frequência 5 MHz e com os animais em estação, Dickie et al. (1999) tiveram sucesso na localização de apenas 38% das estruturas.

Apenas um FPO apresentou tamanho menor do que cinco mm, correspondente a 2,7% dos folículos ovulados. Esta proporção foi maior do que encontrada por um grupo canadense, que observou que apenas 1,7% dos folículos pré-ovulatórios (FPO) apresentavam tamanho máximo, menor do que os cinco mm (DUGGAVATHI et al., 2003).

A incidência de CLs cavitários em nossa investigação, foi superior àquela descritas por CONTRERAS-SOLIS et al., (2007), que utilizaram ovelhas em fases aleatórias do ciclo estral, e inferior aos percentuais descritos por GONZALEZ DE BULNES et al. (2000) e DUGGAVATHI et al. (2003), em animais lanados. Tomando-se como base, que estas identificações foram realizadas apenas na fase lútea recente, a tendência deste número é baixar com o avançar da fase, sendo encontradas menores proporções de cavidades na estrutura do CL nas fases média à tardia (BARTLEWSKI et al., 1999).

Uma das ovelhas do grupo BE-EI apresentou concentrações de progesterona abaixo de 1ng/mL, demonstrando a ocorrência de regressão prematura de CL, fato comum na espécie caprina (SAHARREA et al., 1998). Estes autores demonstraram que a utilização de hCG após início do estro, previne tal regressão em cabras. Em vacas, a ovulação de folículos pequenos gera a formação de CLs menores e, conseqüentemente, secretam menores quantidades de

progesterona (VASCONCELOS et al., 2001). O FPO da ovelha com regressão precoce de CL foi o único que apresentou valores abaixo de 5,5 mm.

Duggavathi et al. (2003) verificaram, por até 72 horas após a ovulação, a existencia de uma correlação positiva ($r=0,88$), entre a concentração de progesterona e a área do CL. Essa correlação foi superior ao coeficiente encontrado nesse experimento ($r=0,643$). Com base nesta correlação pode-se sugerir que o tamanho do CL é um determinante para as dosagens de progesterona na fase lútea recente, por outro lado na fase média não é o melhor parâmetro, em função da interferência de fatores como a interações parácrinas com folículos terciários, sobre o controle da produção de progesterona (SHABANKAREH et al., 2009). Estas interações entre as interações dos FPO e as concentrações de progesterona circulantes são verificadas em experimentos envolvendo pequenos ruminantes (MENCHACA & RUBIANES, 2004; YU et al., 2005).

Bartlewski et al. (2004) observaram que 24 horas após a retirada do implante de progesterona, o GnRH foi necessário para formação de CLs saudáveis em ovelhas que se apresentam em anestro. Um aporte prévio de progesterona é necessário para regular o padrão de secreção do GnRH, promovendo uma sensibilização prévia, promovendo de maior amplitude e frequência no padrão de secreção de GnRH após retirada da progesterona, produzindo CL mais saudáveis (PEARCE et al., 1985; HUNTER, 1986), sugerindo que o progestágeno afeta diretamente no padrão de crescimento dos folículos pré-ovulatórios (HUNTER et al., 1986), possibilitando um aumento no número de receptores de LH nos folículos terciários de ovelhas em anestro, tratadas com GnRH depois de implante com progesterona (KHALID et al., 1997).

Embora com GnRH, tenha apresentado uma taxa de gestação numericamente maior do que o protocolo de longa duração, as concentrações de progesterona não obedeceram a tendência que esteve presente no grupo GnRH do experimento I. Talvez a taxa de gestação tenha sofrido com as mudanças climáticas e a conseqüente não demonstração de comportamento de estro por parte dos animais, sendo necessários mais estudos para o teste de fertilidade de tal protocolo. Luther et al. (2007) observaram menor incidência de comportamento estral em ovelhas hampshire e montadale tratadas com GnRH, sem qualquer aporte de eCG, porém quando se lançava mão da associação com a eCG, as taxas de demonstração do estro retornavam. O GnRH induz o pico pré-ovulatório de LH, cerca de 2 horas após sua injeção intra-muscular (RUBIANES et al., 1998), levando a crer, que no experimento de Luther et al. (2007), houve indução da ovulação antes dos sinais do estro. O intervalo entre início do estro e o momento do pico pré-ovulatório de LH, varia de acordo com a raça, ocorrendo cerca de 18 horas em raças prolíficas e entre seis e sete horas nas raças não prolíficas (LAND et al., 1973). No presente experimento a utilização do GnRH não promoveu este comprometimento, embora tenha acontecido a antecipação, não houve diferença entre as medianas. Ao mesmo tempo, que ao fazer associação com benzoato de estradiol (BE) no início do protocolo, houve uma desregulação no FPO subsequente, promovendo uma dispersão nestas ovulações.

Não houve efeito benéfico da utilização da lecirelina sobre nenhum dos parâmetros estudados, inclusive com relação a inseminação artificial, além disto, a utilização do benzoato de estradiol no início do tratamento, promoveu uma maior dispersão das ovulações, assim como um prejuízo na função luteal das ovelhas tratadas, refletindo nas menores concentrações plasmáticas de progesterona.

Conclui-se ainda com este estudo, que a área ultrassonográfica do corpo lúteo em ovelhas, quatro dias após ovulação, não foi eficaz para distinguir os grupos com maiores concentrações de progesterona plasmática circulante, embora tenha-se obtido correlação positiva ($r=0,643$; $p<0,01$) entre estes parâmetros. Mais estudos devem ser conduzidos, no sentido de obter-se informações sobre o efeito da administração de GnRH como indutor de ovulação, como fator luteotrófico e seus reais benefícios acerca das taxas de gestações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Tecnopec[®], representada na pessoa da Dr^a Isabel Santos e a Juliana Gadum de Lalla pelo auxílio na seara da ciência estatística.

REFERÊNCIAS¹

- ARAÚJO, B.R.; BISCARDE, C.E.A.; MARTINS, L.E.P.; BITTENCOURT, R.F.; GORDIANO, H.D.; SIQUEIRA, J.B.; COELHO, D.V.; RESENDE, J.; GUSMÃO, A.L. Influência do estágio de desenvolvimento do embrião implantado e número de ovulações observadas em ovelhas receptoras de embriões da raça Dorper previamente congelados. **Acta Veterinariae Scientiae**, v.35, supl.3, p.s1234, 2007.
- 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. 115-119, 1999.
- BARTLEWSKI, P.M.; ARAVINDAKSHAN, J.; BEARD, A.P.; NELSON, M.L.; BATISTA-ARTEAGA, M.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Effects of medroxyprogesterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes **Animal Reproduction Science**, v.81, p.63–75, 2004.
- BO, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, D., CUTAIA, L., CACCIA, M., TRIBULO, R., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J., The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.
- BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SILVA MAIA, M.S; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, s.127-130, 2005.
- BICUDO, S.D. Bases para a elevação da eficiência reprodutiva dos rebanhos ovinos. **IN: Simpósio Paulista de Ovinocultura, 7, Anais...** São Paulo-SP, 2006.
- CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; PRANDI, A.; GALIERO, G.; D'OCCHIO, M.J. Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes, treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. **Theriogenology**, v.67, p.1393–1398, 2007.

¹ Referenciação segundo normas da Revista Ciência Rural

CONTRERAS-SOLÍS, I.; DÍAZ, T.; LÓPEZ, G.; CAIGUA, A.; GARCÍA, H.; SALVADOR, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección y medición de cuerpos lúteos en ovejas de pelo. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.15, n.3, p.114-118, 2007.

DICKIE, A.M.; PATERSON, C.; ANDERSON, J.L.M.; BOYD, J.S. Determination of Corpora lutea numbers in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. **Theriogenology**, v.51, p.1209–1224, 1999.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, A.P.; RAWLINGS, N. C. Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological and functional correlates. **Biology of Reproduction**, v.69, p.634-639, 2003.

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

GONZALEZ DE BULNES, A.; SANTIAGO MORENO, J.; GOMEZ BRUNET, A.; LOPEZ SEBASTIÁN, A. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.65, 2000.

HUNTER, M.G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.43, p.91–99, 1986.

HUNTER, M.G.; SOUTHEE, J.A.; MCLEOD, B.J.; HARESIGN, W. Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anoestrous ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p.349–363, 1986.

KHALID, M.; BASIOUNI, G.F.; HARESIGN, W. Effect of progesterone pre-treatment on steroid secretion rates and follicular fluid insulin-like growth factor-1 concentrations in seasonally anoestrous ewes treated with gonadotrophin-releasing hormone. **Animal Reproduction Science**. v.46, p.69–78, 1997.

LAND, R.B.; PELLETIER, J.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation of plasma LH concentration in sheep. **Journal of Endocrinology**, v.58, p.305-317, 1973.

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

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

MCDICKEN, W.N. Introduction to diagnostic ultrasonics. In:_____. **Diagnostic Ultrasonics – Principles and use of instruments**.Ed. Churchill Livingstone. 1991. 1-14pp.

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

OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Laparoscopy in the ewe: a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 3, n.2, p. 119-124, 1980.

PEARCE, D.T.; MARTIN, G.B.; OLDHAM, C.M. 1985. Corpora lutea with a short-lifespan induced by rams in seasonally anovulatory ewes are prevented by progesterone delaying the preovulatory surge of LH. **Journal Reproduction and Fertility**, v.75, p.79–85, 1985.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915–923, 1995.

QUIRKE, J.F.; HANRAHAN, J.P., GOSLING, J.P. Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. **Journal of Reproduction and Fertility**, 61, p.265-272, 1981.

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

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEJÍA, 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.

SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v.49, p. 1133-1140, 1993.

SHABANKAREH, H.K.; HABIBIZAD, J.; TORKI, M. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.362–369, 2009.

SINGH, J.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.35–44, 1997.

ŚLOŚARZ, P.; FRANKOWSKA, A.; MIŚ, M. Transrectal ultrasonography in diagnosing ovulation rate in sheep. **Animal Science Papers and Reports** v.3, p.183–189, 2003.

TURK, G.; GUR, S.; BOZKURT, T.; AKSU, E.H.; AKSOY, H. Effect of exogenous GnRH at the time of artificial insemination on reproductive performance of Awassi ewes synchronized with progestagen-PMSG-PGF2alfa combination. **Reproduction Domestic Animals** 43, 308–313, 2008.

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. **Animal Science**, v. 68, n.3, p. 349-353, 1999.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, p.307–314, 2001.

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

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.69–79, 2004.

YO, Y.S.; LUO, M.J.; HAN, Z.B.; LI, W.; SUI, H.S.; TAN, J.H. Serum and follicular fluid steroid levels as related to follicular development and granulosa cell apoptosis during the estrus cycle of goats. **Small Ruminant Research**, v.57, p.57-65, 2005.

ANEXOS 1 – Segundo as normas da revista *Ciência Rural***Tabela 01.** Frequência acumulada das ovulações em ovelhas Santa Inês submetidas à sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH).

Momento (horas)	GRUPO			
	Controle	BE	GnRH	BE+GnRH
44	0/6* (0,0)	1/6 (16,6)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)
52	0/6 (0,0)	1/6 (16,6)	5/6 (83,3)	1/6 (16,6)
60	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)
68	6/6 (100,0)	2/6 (33,3)	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)
76	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)
84	6/6 (100,0)	4/6 (66,6)	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)
92	6/6 (100,0)	4/6 (66,6)	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)
100	6/6 (100,0)	4/6 (66,6)	6/6 (100,0)	3/6 (50,0)
108	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)	6/6 (100,0)	4/6 (66,6)
116	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)	6/6 (100,0)	4/6 (66,6)
124	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)	6/6 (100,0)	4/6 (66,6)
132	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)
140	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)
148	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)
156	6/6 (100,0)	6/6 (100,0)	6/6 (100,0)	5/6 (83,3)

* número de ovelhas que ovularam/total do grupo (porcentagem de ovelhas que ovularam)

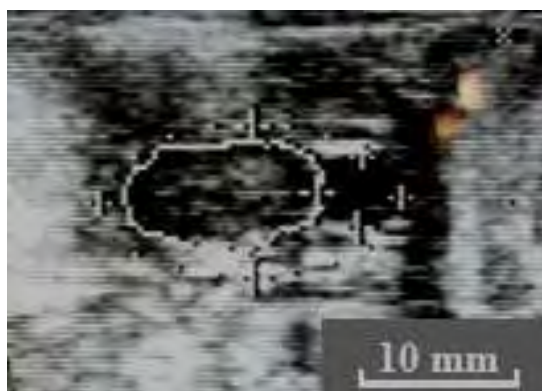


Figura 04. Imagem ultrassonográfica com a delimitação de corpo lúteo através de traço, e ao lado um folículo (estrutura hipocóica em escala de 10 mm).

Tabela 02. Parâmetros de estro e ovulação em ovelhas Santa Inês submetidas à sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH).

Grupo	Parâmetro*			Número de Ovulações
	Tempo (h)**			
	Ovulação	Início do Estro	Estro/Ovulação	
Controle	68,0	32,0	32,0	1,5
BE	80,0	32,0	40,0	1,0
GnRH	52,0	28,0	24,0	2,0
BE+GnRH	71,2	36,0	40,8	1,2

*valores representados pela mediana **Em relação a retirada do aporte de P4 (P>0,05)

Tabela 03. Avaliação das áreas ultrassonográficas dos corpos lúteos (CL) pelos modos de contorno “traço” e “elíptico”, após sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH).

Grupo	Área Lútea (mm ²)*			
	Total Traço	Traço/CL	Total Elipse	Elipse/CL
Controle	6,9 ± 1,0	4,7 ± 0,3	6,8 ± 0,8	4,7 ± 0,3
BE	5,7 ± 0,7	5,1 ± 0,8	5,4 ± 0,7	4,3 ± 0,8
GnRH	10,0 ± 1,6	4,9 ± 0,3	9,3 ± 1,3	4,6 ± 0,2
BE+GnRH	7,1 ± 1,2	6,1 ± 1,1	6,6 ± 1,2	5,7 ± 1,0
CV**	39,0	33,5	36,4	34,5
P***	0,106	0,540	0,093	0,500

*valores representados pela média ± DP **CV coeficiente de variação ***Probabilidade estatística

Tabela 04. Duração do estro, diâmetro (\emptyset) do folículo ovulatório, níveis plasmáticos de progesterona (P4) no quarto dia pós ovulação e áreas luteais de “traço” e “elipse” após sincronização de estro com Benzoato de Estradiol (BE) e/ou Lecirelina (GnRH).

Grupo	Duração do Estro (h)	Nível de P4 (ng/mL)	\emptyset Folículo Ovulatório (mm)	Área CL (mm ²)	
				Traço	Elipse
Controle	38,7 ± 3,4	2,4 ± 0,3 ^{ab}	7,4 ± 0,3	4,9 ± 0,3	4,8 ± 0,3
BE	69,3 ± 15,4	1,5 ± 0,3 ^b	7,0 ± 0,6	5,1 ± 0,8	4,8 ± 0,7
GnRH	37,3 ± 5,6	3,2 ± 0,3 ^a	6,8 ± 0,3	5,6 ± 0,5	5,2 ± 0,4
BE+GnRH	68,0 ± 12,9	2,4 ± 0,4 ^{ab}	7,4 ± 0,6	6,2 ± 1,1	5,8 ± 1,0
CV*	48,5	35,3	16,0	33,1	31,9
P**	0,065	0,017	0,766	0,660	0,733

*valores representados pela média ± ER

*CV coeficiente de variação

**Probabilidade estatística

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas (P<0,05) entre os valores

CAPÍTULO – III

Artigo encaminhado para Magistra

ISSN 0102-5333

Parâmetros foliculares em ovelhas Santa Inês submetidas a protocolo de curta duração associado ou não a benzoato de estradiol e/ou lecorelina

BISCARDE, C.E.A.; BICUDO, S.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.O.; BITTENCOURT, R.F.; FERREIRA, D.O.L.; MONTEIRO, C.D.; OBA, E.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – Botucatu

RESUMO

O devido conhecimento dos eventos ovarianos associados à manipulação do ciclo estral se faz necessário para que se tenha um perfeito aproveitamento desta biotecnologia, tendo-se como objetivo final à concentração das ovulações no intervalo de tempo conhecido. Neste experimento avaliou-se a resposta ovariana ao protocolo de curta duração associado ou não a lecorelina (análogo de GnRH) e/ou benzoato de estradiol. 24 ovelhas Santa Inês cíclicas foram divididas em quatro grupos: Grupo controle (GC; n=06) – com administração de 45µg de *d*-cloprostenol (Prolise® - Tecnopec) no dia zero, colocação da esponja vaginal impregnada com acetato de medroxi-progesterona (MAP60® - Tecnopec) no dia três, retirada da esponja juntamente com aplicação de 400UI de eCG e 45 µg de *d*-cloprostenol no dia sete; Grupo BE (BE; n=06) - submetido ao mesmo tratamento do GC, adicionando-se a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia um; Grupo GnRH (GnRH; n=06) – tratado de forma similar ao GC com a aplicação de 25µg de lecorelina (Gestran plus® - Tecnopec), 30 horas após a retirada da esponja; Grupo BE-GnRH (BE-GnRH; n=06) - tratado de forma similar ao GC, com a administração de 1 mg de BE no dia um e 25µg de lecorelina 30 horas após a retirada da esponja. As ovelhas tiveram os ovários monitorados através de ultrassonografia (US) transretal. O desaparecimento do folículo pré-ovulatório foi constatado em 23 dos 24 animais, uma ovelha do BE-GnRH não ovulou e foi excluída do experimento. O tamanho médio do maior folículo pré-ovulatório foi de 7,3mm (GC); 7,0mm (BE); 6,8mm (GnRH); 7,4mm (BE-GnRH) não havendo diferença entre eles ($P>0,05$), sendo encontrado 1,83; 1,16; 2; 1,4 folículos ovulados por animal para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Dados relacionados ao início do estro após a retirada da esponja e duração do estro obteve-se para os GC 32/38,6; BE 37/69,3; GnRH 29,3/37,3; BE-GnRH 44/68 horas, respectivamente. Tempo de ovulação foi GC 65,3; BE 88; GnRH 53,3; BE-GnRH 82,4 horas após a retirada da esponja. Desta forma há necessidade de mais estudos com maior número de fêmeas tendo necessidade do teste de fertilidade. Além disto novos experimentos deverão ser realizados para avaliar a responsividade do ovário a manipulação da sua função com o benzoato de estradiol e com GnRH.

Palavras-chave: Ovelhas. Sincronização de estro. Ultrassonografia.

Follicular parameters in Santa Ines ewes subjected to short-time protocol associated or not with estradiol benzoate and/ or lecorelin.

BISCARDE, C.E.A.; BICUDO, S.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; BITTENCOURT, R.F.; FERREIRA, D.O.L.; MONTEIRO, C.D.; OBA, E.

**School of Veterinary Medicine and Animal Science – São Paulo State University
Júlio Mesquita Filho – Botucatu**

ABSTRACT

It is necessary to have good knowledge of the ovarian events that are associated with estrus cycle manipulation in order to assemble ovulations in a predicted time interval. This experiment assessed the ovarian response to a short-time protocol associated or not with lecorelin (GnRH analogous) and/or estradiol benzoate. 24 cycling Santa Inês ewes were divided into four groups as follow: control group (CG; n=06) with the administration of 45µg of *d*-cloprostenol (Prolise® - Tecnopec) on day 0, insertion of vaginal sponge soaked with medroxi-progesterone acetate (MAP60® - Tecnopec) on day 3, and sponge withdrawal together with the injection of 400UI of eCG, and 45 µg of *d*-cloprostenol on day 7; EB group (EB; n=06) – subjected to the same G1 treatment but it was added the injection of 1 mg of estradiol benzoate (EB) on Day 1; GnRH group (GnRH; n=06) that had similar treatment to CG with the application of 25µg of lecorelin (Gestran plus® - Tecnopec), 30 hours after sponge withdrawal; EB-GnRH group (EB-GnRH; n=06) that had similar treatment to CG with the administration of 1 mg of EB on Day 1 and 25µg of lecorelin 30 hours after sponge withdrawal. Ewes had their ovaries monitored via transrectal ultrasound examination. It was observed the disappearance of the preovulatory follicle in 23 out of 24 animals, and one ewe from G4 did not ovulated and thus was excluded from the experiment. The average size of the biggest preovulatory follicle was 7.3mm (CG); 7.0mm (GnRH); 6.8mm (EB); 7.4mm (EB-GnRH) with no significant difference among groups ($P>0.05$), As for ovulated follicles per animal, it was found 1.83; 1.16; 2; 1.4 for groups CG, GnRH, EB and EB-GnRH, respectively. Related data to the onset of estrus after sponge removal and estrus length was for the duration of CG 32/38, 6, GnRH 37/69, 3; EB 29.3 / 37.3, EB-GnRH 44/68 hours, respectively. Ovulation time was 65.3; 88; 53; 82.4 hours after sponge withdrawal for groups CG, EB, GnRH and EB-GnRH, respectively. Hence, further studies are needed with a bigger number of females as well as the use of a fertility test. Besides, it is also needed further studies to evaluate the ovarian response to estradiol benzoate and GnRH.

Keywords: Ewes, estrus synchronization, ultrasound

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura está em franca ascensão na pecuária brasileira, estando estado de São Paulo registrando as maiores taxas de crescimento da atividade no país, buscando-se animais deslanados provenientes principalmente da região nordeste, podendo se destacar animais da raça Santa Inês. Para que seja feita a disseminação do material genético superior desta raça, se faz necessário à utilização de biotecnologias da reprodução animal, sendo a sincronização e indução de estro.

A identificação de estro é um entrave na implementação de programas de inseminação artificial (IA) em ovelhas, isto por aumentar os trabalhos e custos com manejo e mão de obra, havendo a necessidade de sincronização e indução da ovulação. Por outro lado esta biotecnologia, geralmente possui menores índices de prenhez (GORDON, 1993). Daí a necessidade de associá-la a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com protocolos onde as ovulações se concentram no menor espaço de tempo.

Para tanto o devido conhecimento dos eventos ovarianos associados à manipulação do ciclo estral se faz necessário para que se tenha um perfeito aproveitamento desta biotecnologia, tendo-se como objetivo final à concentração das ovulações no intervalo de tempo conhecido, onde os folículos devem apresentar o mesmo grau de desenvolvimento, não estando um mais velho do que o outro.

Pretende-se com a aplicação do benzoato de estradiol (BE) promover uma imediata regressão de folículos existentes e/ou uma ovulação inicial, possibilitando o surgimento de nova onda de crescimento folicular e com sua associação ao GnRH promover um agrupamento do momento ovulatório nas ovelhas.

Outro objetivo foi avaliar a eficiência do acompanhamento ultrassonográfico do crescimento folicular, a partir de folículos com diferentes estágios de desenvolvimento e a suas interrelações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro ovelhas Santa Inês cíclicas, alimentadas diariamente com 600g de ração concentrada, feno e água *ad libitum*, foram divididas em quatro grupos.

O Grupo Controle (GC; n=06) – com administração de 45µg de *d*-cloprostenol (Prolise[®] - Tecnopec) no dia zero, colocação da esponja vaginal impregnada com acetato de medroxi-progesterona (MAP60[®] - Tecnopec) no dia três, retirada da esponja juntamente com aplicação de 400UI de eCG e 45 µg de *d*-cloprostenol no dia 7; Grupo BE (BE; n=06) - submetido ao mesmo tratamento do GC, adicionando-se a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia um; Grupo GnRH (GnRH; n=06) – tratado de forma similar ao GC com a aplicação de 25µg de lecirelina (Gestran plus[®] - Tecnopec), 30 horas após a retirada da esponja; Grupo BE-GnRH (BE-GnRH; n=06) - tratado de forma similar ao GC, com a administração de 1 mg de BE no dia um e 25µg de lecirelina 30 horas após a retirada da esponja. As duplas aplicações de *d*-cloprostenol estão associadas ao modelo teórico de crescimento folicular e ovulação proposto por Menchaca e Rubianes (2004).

As ovelhas tiveram os ovários monitorados através de ultrassonografia (US) transretal (SSD-500, Aloka Co[®]), com auxílio de probe prostática de 7,5 MHz. As avaliações foram feitas a cada oito horas entre os dias zero e três e do dia sete até a observação da ovulação, no intervalo dos dias quatro a seis os exames ultrassonográficos foram realizados a cada 12 horas. O folículo pré-ovulatório era mensurado em dois eixos, vertical e horizontal, com auxílio do caliper do aparelho de ultrassom, obedecendo às maiores distâncias destes eixos.

A observação de estro era executada após os exames de US, logo após a retirada da esponja, até a não demonstração dos sinais. A ovulação era constatada após desaparecimento dos folículos pré-ovulatórios, para taxa de ovulação foi realizada a razão da quantidade de folículos ovulados pelo número de animais. Para análise estatística empregou-se o programa sigma stat 3.5, os coeficientes de variação foram transformados utilizando raiz de $X + 0,5$; e assim feito o teste de normalidade para empregar os devidos pacotes estatísticos. Sendo que para a avaliação das populações foliculares foi empregado o teste paramétrico para dupla entrada, two way repeatead mensures, pelo bonferroni test. Neste haviam quatro classes de tamanho (1-menor que 3 mm) (2-entre 3 e 4) (3 – entre 4 e 5,5) (4 – mais que 5,5), onde o 1, 2, 3 e 4 são pequenos, médios, grandes e folículos pré-ovulatórios (FPO).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente ao início do experimento foi realizada a quantificação da concentração plasmática de progesterona (P_4) por radioimunoensaio das fêmeas, isto em duas amostras pareadas em intervalo de sete dias para demonstração ou não de ciclicidade. Todas as ovelhas apresentaram amostra de P_4 acima de 1 ng/mL em pelo menos um dos ensaios. O desaparecimento do folículo pré-ovulatório foi constatado em 23 dos 24 animais, uma ovelha do G4 não ovulou e foi excluída do experimento na avaliação dos parâmetros pré-ovulatórios. O tamanho médio do maior folículo pré-ovulatório foi de 7,3mm (GC); 7,0mm (BE); 6,8mm (GnRH); 7,4mm (BE-GnRH) não havendo diferença entre eles ($P>0,05$), estes achados corroboram com experimento realizado em ovelhas Merino, não encontrando diferença entre os animais cíclicos que utilizaram ou não o GnRH, porém esta administração realizada 36 horas após a retirada da esponja (REYNA et al., 2007). Com relação à taxa de ovulação foi observado um decréscimo numérico nos grupos que foram realizadas administração do benzoato de estradiol, sendo encontrados 1,83; 1,16; 2; 1,4 folículos ovulados por animal para os grupos Controle, BE, GnRH e GnRH-BE, respectivamente. Desta forma, o objetivo de possibilitar o surgimento de maior número de folículos novos após a administração do benzoato de estradiol (BE), não foi observado, sendo necessários estudos com maior número de animais e com a observação da prolificidade destas fêmeas, já que não foi encontrada diferença significativa, no momento da aplicação do BE, apenas dois animais apresentaram ovulação, com estes achados não foi possível a confirmação de experimentos *in vitro*, onde em presença de estradiol a liberação do GnRH era potencializada (GHUMAN et al., 2006; GHUMAN et al., 2008). Da mesma forma a não redução na

quantidade de folículos durante as avaliações da população folicular, após a aplicação do BE, leva-nos ao resultado não esperado acerca da diminuição da população folicular, assim como as ovulações dos FPO, prontos para ovular, no momento da sua administração (Tabela 05).

Tendo em vista estes resultados, a ovelha não responde tão bem a utilização do benzoato de estradiol como quando utilizado em vacas (BÓ et al., 2002). A observação de diminuição no número de folículos só foi observada, a partir do momento em que foram ocorrendo às ovulações (Gráficos 01, 02, 03 e 04).

Por outro lado a observação das ondas foliculares que são observadas por outros grupos de estudo (GINTHER et al., 1995), não foi possível observar devido ao intenso surgimento e desaparecimentos de folículos pequenos (menores que 3mm), os quais é sabido que oscilam muito no desenvolvimento, sendo dificultoso a sua diferenciação e o acompanhamento detalhado via ultrassonografia (VIÑOLES et al., 2004).

Utilizando ovelhas da raça Sulffolk Takada (2004) não observou sincronia no surgimento de onda folicular da onda, tampouco a supressão do crescimento dos folículos, com as doses de 0,1 a 0,3 mg de benzoato de estradiol.

Dados relacionados ao início do estro após a retirada da esponja e duração do estro obteve-se para os GC 32/38,6; BE 37/69,3; GnEH 29,3/37,3; BE-GnRH 44/68 horas, respectivamente. Por fim o tempo de ovulação foi GC 65,3; BE 88; GnRH 53,3; BE-GnRH 82,4 horas após a retirada da esponja, tendo-se observado para o grupo do GnRH uma maior sincronia, aproximando-se das 52 horas após a retirada do pessário vaginal, 5 animais de 6 ovularam nestas 52 horas.

Desta forma há necessidade de mais estudos com maiores números de fêmeas, para a confirmação destes achados, além da necessidade do teste de

fertilidade. Luther et al. (2007) utilizando inseminação artificial por laparoscopia 54 a 60 horas após a retirada da P₄ em protocolo de longa duração associado a eCG e/ou GnRH no momento e 36 horas após a retirada do implante, respectivamente, não encontraram diferença com relação a taxa de gestação entre a utilização só do eCG ou do GnRH, ou da associação, porém o GnRH sozinho afetou a taxa de demonstração de estro, dado não apresentado no presente estudo.

Desta forma a utilização de análogos devem ser mais estudados na indução de ovulação em ovelhas deslanadas, da mesma forma a ação do BE na atividade ovariana seja com progesterona alta ou baixa, utilizando maior número de animais.

4. CONCLUSÕES

1. A observação e a continuidade no monitoramento dos folículos menores do que três mm foi um limitante, devido à sua oscilação de desenvolvimento rápido, além da obtenção de imagens por cortes transversais na estrutura com este diâmetro por ondas ultrassonográficas, não apresentarem precisão no mesmo folículo com o transcorrer dos exames. Com isto, a eficiência do acompanhamento ultrassonográfico destes folículos é prejudicada. Entretanto, obtém-se maior eficiência no acompanhamento de folículos grandes, do momento ovulatório e a avaliação do tamanho dos corpos lúteos;

2. A aplicação de benzoato de estradiol no início do tratamento, não diminuiu a população de folículos de qualquer um dos diâmetros avaliados, não ocorrendo o surgimento de uma bem definida onda de crescimento folicular, além de promover uma maior dispersão no tempo de ovulação;

3. A aplicação de lecirelina como indutor de ovulação, promoveu uma antecipação do momento de ovulação no intervalo entre 52 e 60 horas, em relação aos demais tratamentos;

4. Há necessidades de mais estudos envolvendo estes dois hormônios e a avaliação ultrassonográfica, envolvendo aparelhos mais sofisticados tecnologicamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Tecnopec[®] na pessoal da Dr^a Isabel Santos, ao CnPq, a seção de pós graduação em medicina veterinária da FMVZ-UNESP-Botucatu e ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP-Botucatu.

REFERÊNCIAS²

BO, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, D., CUTAIA, L., CACCIA, M., TRIBULO, R., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J., The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.

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

GORDON I. **Controlled reproduction in sheep and goat**, Oxon: CAB International, 1ª ed. p. 86–115, 1997.

GHUMAN, S.P.S.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. Oestradiol stimulates the release of AVP and GnRH from the ewe hypothalamus in vitro. **Reproduction in Domestic Animal**, v.41, p.514–521, 2006.

GHUMAN, S.P.S.; JONES D.N.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. GABA Control of GnRH Release from the Ewe Hypothalamus In Vitro: Sensitivity to Oestradiol. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.531–541, 2008.

LUTHER, J.S.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; KIRSCH, R.M.; WEIGL, R.M.; KRAFT K.C.; NAVANUKRAW, C.; PANT, D.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrus synchronization following laparoscopic AI in ewes. **Small Ruminant Research**, v.72, n.2-3, p.227- 231, 2007.

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

REYNA, J.; THOMSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Sincrony of ovulation and follicular dynamics in merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.4, p. 410-417, 2007.

² Referência segundo normas da Revista Magistra

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk.** 2004. 151. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. **Animal Reproduction Science** v.80, p. 69-79, 2004.

ANEXOS 2 – Segundo as normas da revista Magistra

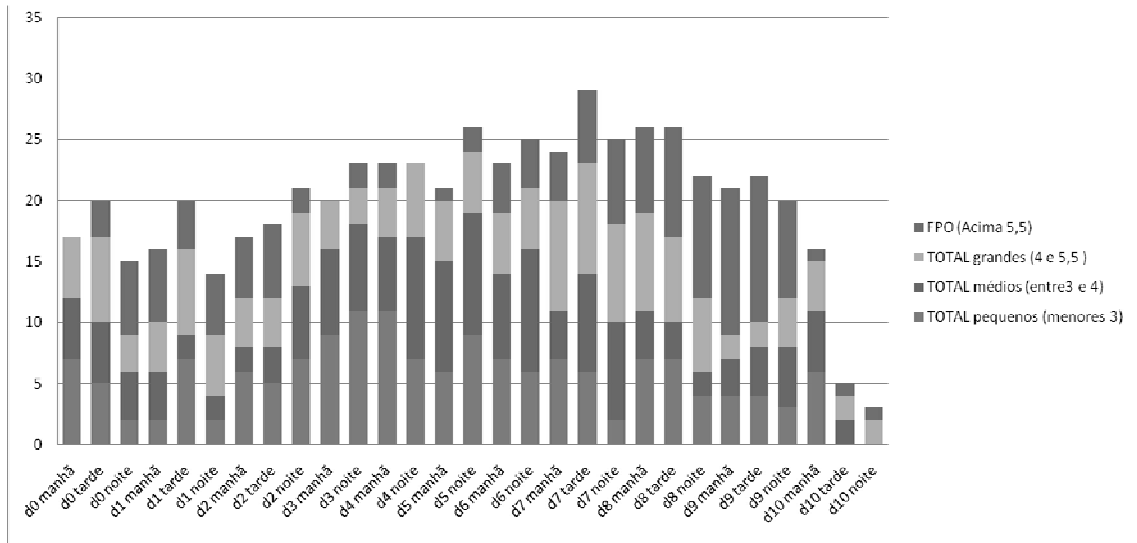


Gráfico 01. Número de folicúlos distribuídos segundo as classes (1-Pequeños - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo Controle. onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF₂alfa; d3 inserção da esponja e d7 pela manhã retirada da esponja e aplicação de eCG. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente.

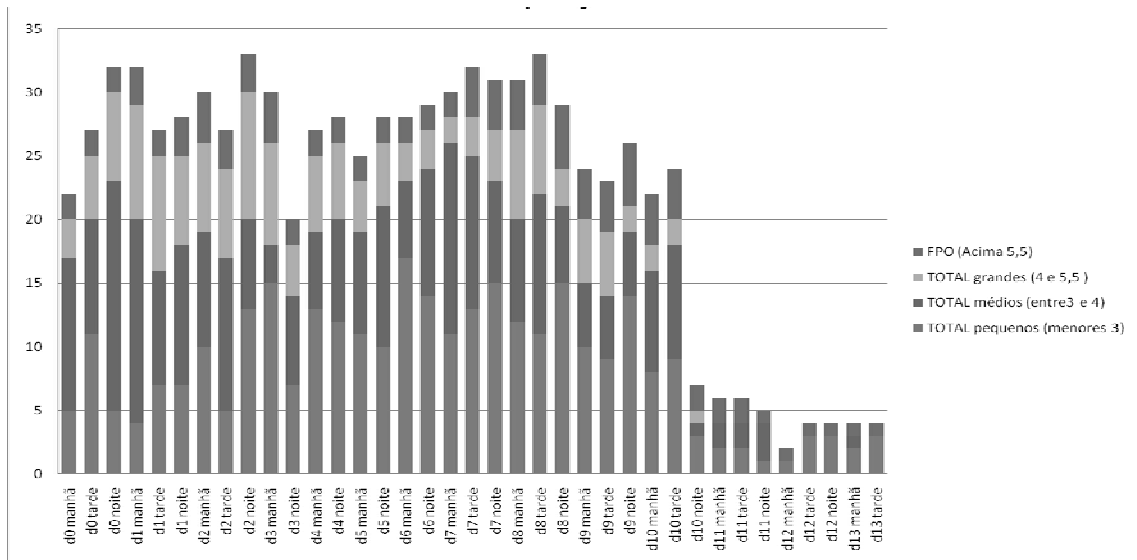


Gráfico 02. Número de folicúlos distribuídos segundo as classes (1-Pequeños - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo BE. onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF₂alfa nos animais de todos os grupos; d1 aplicação de Benzoato de Estradiol; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja e aplicação de eCG. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente.

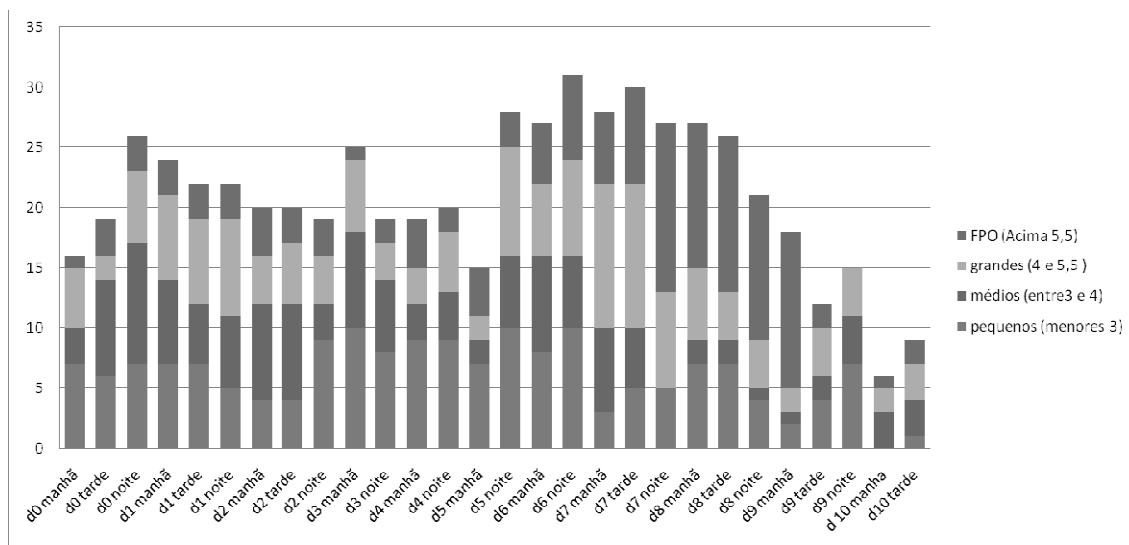


Gráfico 03. Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo GnRH, onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF₂alfa nos animais; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja de todos animais; d8 à tarde aplicação de Lecirelina. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente.

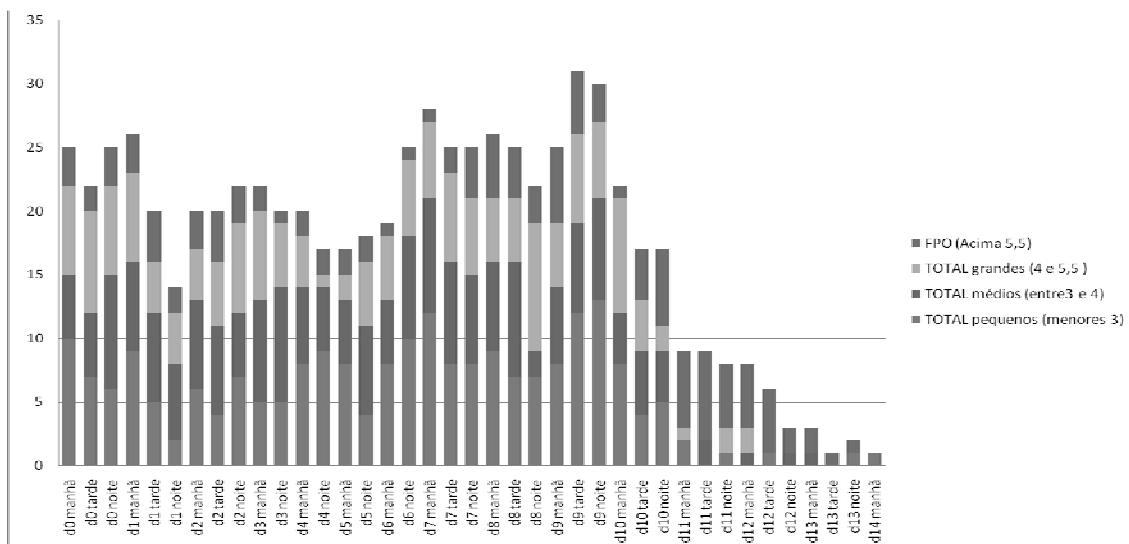


Gráfico 04. Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) do grupo BE-GnRH. Onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF₂alfa nos animais de todos os grupos; d1 aplicação de Benzoato de Estradiol ; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja de todos animais; d8 à tarde aplicação de Lecirelina. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente.

Tabela 5. Tabela 05. Número de folículos distribuídos segundo as classes (1-Pequenos - menor que 3 mm) (2-Médios - entre 3 e 4 mm) (3 – Grandes - entre 4 e 5,5 mm) e (4 – FPO - mais que 5,5 mm) e grupos de tratamento, onde d0 corresponde ao início das mensurações ultrassonográficas e aplicação de PGF₂alfa nos animais de todos os grupos; d1 aplicação de Benzoato de Estradiol nos grupos BE e BE + GnRH; d3 inserção da esponja nos animais de todos os grupos; d7 pela manhã retirada da esponja e aplicação de eCG em todos animais; d8 à tarde aplicação de Lecirelina nos grupos GnRH e BE+GnRH. A avaliação foi executada até o desaparecimento do FPO, confirmado em exame subsequente.

CONTROLE

Classe	d0		d1		d2		d3		d4		d5		d6		d7		d8		d9				
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T			
Pequeno	1,17	0,83	0,33	1,17	0,33	1,0	0,83	1,17	1,5	1,83 ^b	1,17 ^{ab}	1,0 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,17	1,0	1,17	1,0	0,33	1,17	1,17	0,67 ^{ab}	0,67 ^b	0,5
Médio	0,83	0,83	0,67	0,33	0,33	0,33	0,5	1,0	1,17	1,17 ^{ab}	1,67 ^b	1,5 ^b	1,67 ^b	1,17	1,67	1,33	1,33	0,67	0,5	0,33 ^a	0,5 ^a	0,67 ^b	0,83
Grande	0,83	1,17	0,5	0,67	1,17	0,83	0,67	1,0	0,67	0,5 ^a	0,67 ^{ab}	0,83 ^{ab}	0,83 ^{ab}	0,83	0,83	1,5	1,5	1,33	1,33	1,17	1,0 ^{ab}	0,33 ^b	0,67
FPO	0 ^A	0,5	1,0	0,67	0,83	0,83	1,0	0,33	0,5	0,33 ^a	0 ^{Aa}	0,17 ^a	0,33 ^a	0,67	0,67	1,0	1,17	1,5	1,17	1,5	1,67 ^b	2,0 ^{Ba}	1,33

BE

Classe	d0		d1		d2		d3		d4		d5		d6		d7		d8		d9				
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T			
Pequeno	0,8 ^{ab}	1,67	1,17 ^{ab}	0,5 ^{Ba}	1,33	1,17	1,5	1,0	2,17 ^b	1,17	2,5 ^b	1,67	1,67	2,83 ^{Ab}	2,3 ^a	2,17 ^{bc}	2,0	1,83	2,5 ^b	1,67	1,5	2,33 ^b	0,5
Médio	2,17 ^b	1,5	2,83 ^b	3,17 ^{Ab}	1,33	1,83	1,67	1,67	1,5 ^{ab}	0,83 ^B	1,33 ^{ab}	1,67	1,83	0,83 ^{Ba}	1,83 ^{ab}	2,67 ^b	1,17	1,67	0,83 ^{Ba}	0,83 ^B	0,83 ^B	0,67 ^{Ba}	0,5
Grande	0,67 ^{ab}	1,17	1,5 ^{ab}	1,67 ^{ab}	1,67	1,17	1,17	1,3 ^{ab}	0,67	1,0	1,0 ^{ab}	0,67	0,83	0,5 ^a	0,33 ^a	0,5 ^a	1,17	1,17	0,83 ^a	1,0	1,0	0,5 ^a	0,67
FPO	0,33 ^a	0,33	0,33 ^a	0,5 ^a	0,33	0,5	0,67	0,5	0,5 ^a	0,33	0,33 ^a	0,33	0,33	0,33 ^a	0,33 ^a	0,67 ^{ab}	0,67 ^a	0,67	0,83 ^a	0,67	0,67	0,83 ^a	0,83 ^{ab}

GnRH

Classe	d0		d1		d2		d3		d4		d5		d6		d7		d8		d9			
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		
Pequeno	1,17	1,0	1,17	1,17	0,83	0,67	0,67	1,5	1,5	1,17	1,67	1,33	1,67	0,5 ^a	0,83	0,83 ^a	1,17 ^{ab}	1,17 ^{ab}	0,67 ^{ab}	0,33 ^a	0,67	1,17
Médio	0,5	1,33	1,67	1,17	0,83	1,0	1,33	0,5	1,33	0,5	0,67	0,33	1,0	1,17 ^{ab}	0,83	0 ^a	0,33 ^a	0,33 ^a	0,17 ^a	0,17 ^a	0,33	0,67
Grande	0,83	0,33	1,0	1,17	1,33	0,67	0,83	0,67	1,0	0,5 ^{ab}	0,5	1,0	1,33	2,0 ^b	2,0	1,33 ^{ab}	1,0 ^{ab}	0,67 ^a	0,67 ^{ab}	0,33 ^a	0,67	0,67
FPO	0,17 ^{AC}	0,5	0,5	0,5	0,5	0,67	0,5	0,17 ^{AC}	0,33 ^{Aa}	0,67	0,33 ^A	0,67	0,5	0,83	1,17	1,0 ^{ab}	2,0 ^{BEB}	2,17 ^{BDB}	2,0 ^{BEB}	2,17 ^{BDB}	0,33 ^A	0 ^{AC}

BE-GnRH

Classe	d0		d1		d2		d3		d4		d5		d6		d7		d8		d9			
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		
Pequeno	1,67	1,17	1,0	1,5	0,83	0,33	1,0	0,67	1,17	0,83	0,83	1,33	1,67	2,0	1,33	1,33	1,5	1,17	1,17	1,33	2,0	2,17
Médio	0,83	0,83	1,5	1,17	1,17	1,0	1,17	0,83	1,17	0,83	1,33	1,5	1,33	1,17	1,17	1,5	0,33	1,0	1,17	1,33	1,0	1,17
Grande	1,17	1,33	1,17	1,17	0,67	0,83	1,17	1,17	0,83	0,67	0,17	0,33	0,83	0,83	1,0	1,0	0,83	0,83	1,67	0,83	1,17	1,0
FPO	0,5	0,33	0,5	0,5	0,67	0,33	0,5	0,67	0,5	0,33	0,17	0,17	0,17	0,33	0,67	0,83	0,67	0,5	1,0	0,83	0,5	0,5

aa**Letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatística (P<0,05) dos tamanhos entre os momentos, já as letras minúsculas demonstram diferença (P<0,05) entre os tamanhos no mesmo momento. M= manhã, T= tarde; N = noite

CAPÍTULO IV

1. PONTOS CRÍTICOS E REPERCUSSÕES

A ultrassonografia é uma importante ferramenta auxiliar na pesquisa da função ovariana com a oscilação de crescimento folicular, porém a especificidade da mensuração dos folículos menores que três mm, além do acompanhamento da sua oscilação de crescimento ficar prejudicada na dependência do tipo de aparelho, sendo que quanto menor o grau tecnológico, maiores serão limitações encontradas. Por outro lado, o acompanhamento do crescimento de folículos maiores do que quatro mm, a determinação do momento ovulatório e a avaliação do tamanho dos corpos lúteos são totalmente viáveis com o tipo de aparelho utilizado neste trabalho.

Deve ser levado em conta o número de exames ultrassonográficos no decorrer do tempo, uma vez que a maior frequência pode acarretar em alterações da expressão fisiológica dos fenômenos ou mesmo levar à intolerância por parte dos animais examinados, entretanto, maior distanciamento dos exames pode implicar na não detecção das flutuações rápidas no crescimento folicular tornando as observações imprecisas. Na determinação da frequência de exame ultrassonográfico deste trabalho foram levados em conta estes fatores.

As características reprodutivas peculiares às ovelhas devem ser levadas em consideração, evitando-se analogias com os bovinos que nem sempre são válidas ou pertinentes, a exemplo de que entre outras coisas a

primeira ser uma espécie poliovulatória, sendo a utilização do benzoato de estradiol menos efetivo na sincronização de uma nova onda folicular.

A utilização do benzoato de estradiol não se mostrou viável para controle do desenvolvimento folicular na ovelha, por outro lado se faz necessário maior número de estudos envolvendo este hormônio no controle do ciclo estral, abordando doses diferenciadas, em diferentes momentos.

A utilização do análogo do GnRH, lecirelina, na dose de 25µg, como indutor de ovulação foi eficaz, porém novos estudos envolvendo outras estratégias de utilização deste hormônio, com diferentes doses devem ser realizados. Além disto, outros análogos devem ser testados para o controle da função ovariana em ovelhas.

2. CONCLUSÕES GERAIS

1. A observação e a continuidade no monitoramento dos folículos menores do que três mm foi um limitante, devido à sua oscilação de desenvolvimento rápida, além da obtenção de imagens por cortes transversais na estrutura com este diâmetro por ondas ultrassonográficas, não apresentarem precisão no mesmo folículo com o transcorrer dos exames. Com isto, a eficiência do acompanhamento ultrassonográfico destes folículos é prejudicada. Entretanto, obtém-se maior eficiência no acompanhamento de folículos grandes, do momento ovulatório e a avaliação do tamanho dos corpos lúteos.

2. A aplicação de benzoato de estradiol no início do tratamento, não diminuiu a população de folículos de qualquer um dos diâmetros avaliados, não ocorrendo o surgimento de uma bem definida onda de crescimento folicular, além de promover uma maior dispersão no tempo de ovulação.

3. A aplicação de lecirelina como indutor de ovulação, promoveu uma antecipação do momento de ovulação no intervalo entre 52 e 60 horas, em relação aos demais tratamentos.

4. Não houve efeito benéfico da utilização da lecirelina sobre nenhum dos parâmetros estudados, além disto, a utilização do benzoato de estradiol, no início do tratamento, promoveu uma maior dispersão das ovulações, assim como um prejuízo na função luteal das ovelhas, refletindo nas menores concentrações plasmáticas de progesterona.

5. Conclui-se ainda com este estudo, que a área ultrassonográfica do corpo lúteo em ovelhas, quatro dias após ovulação, não foi eficaz para distinguir os grupos com maiores concentrações de progesterona plasmática

circulante, embora tenha-se obtido correlação positiva ($r=0,643$; $p<0,01$) entre estes parâmetros.

6. Há necessidade de mais estudos a respeito da utilização de lecirelina como indutor de ovulação e como fator luteotrófico com seus reais benefícios acerca das taxas de gestações, bem como a do benzoato de estradiol no processo de sincronização de ciclo estral de ovelhas Santa Inês.

REFERÊNCIAS

AMBROSE, J.D.; PIRES, M.F.A.; MOREIRA, F.; DIAZ, T.; BINELLI, M.; THATCHER, W.W. Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v.50, p.1157–1170, 1998.

ANUALPEC – **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: AgraFNP, p.277, 369p. 2006.

BAIRD, D.T. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle en sheep and human, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.69, p. 343-352, 1983.

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

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; CHAPMAN, C.L.; NELSON, M.L.; PALMER, B.; ARAVINDAKSHAN, J. Ovarian responses in GnRH-treated anoestrous ewes: follicular and endocrine correlates with luteal outcome. **Reproduction Fertility Development**, v.13: p.133–142, 2001.

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

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.27: p.120-127, 2003.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SILVA MAIA M.S; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. 2005. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33(1), s127-130, 2005.

BISCARDE, C.E.A.; BICUDO, S.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.O.; BITTENCOURT, R.F.; FERREIRA, D.O.L.; MONTEIRO, C.D.; OBA, E. Morfometria e função luteais em ovelhas Santa Inês cíclicas submetidas a protocolo de sincronização de estro com medroxiprogesterona e *d*-cloprostenol associados ao benzoato de estradiol e lecirelina. Congr. Bras. Reprod. Anim., 18, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, p. 428, 2009.

BECK, N.F.G.; JONES, M.; DAVIES, B.; MANN, G.E.; PETERS, A.R. The effect of the GnRH analogue (buserelin) on day 12 post mating on ovarian structure and plasma oestradiol and progesterone concentration in ewes. **Animal Science**, v.63, p.407–412, 1996.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotrophins in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.225–239, 1993.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 α treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555–1569, 1994.

BO, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.

BOLET, G. Timing and extent of embryonic mortality in pigs, sheep and goats: genetic variability. 1986. In: SREENAN, J.M., DISKIN, M.G. (Eds.), **Embryonic Mortality in Farm Animals**. Martinus Nijhoff, Hague, 12–43p.

BOLT, D.J.; KELLEY, H.E.; HAWK, H.W. Release of LH by Estradiol in Cycling Ewes. **Biology of Reproduction**. 4:35-40, 1971.

BOWEN, J. M.; DAHL, G. E.; EVANS, N. P.; THRUN, L. A.; WANG, Y.; BROWN, M. B.; KARSCH, F. J. Importance of the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Surge for Induction of the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge of the Ewe: Dose-Response Relationship and Excess of GnRH. **Endocrinology**, v.139(2), p.588-595, 1998.

BOYD, J.S.; DUCKER, M.J. A method of examining the cyclic changes occurring in the sheep ovary using endoscopy. **Veterinary Record**, v.90, p.40-43, 1973.

CAM, M.A.; KURAN, M. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep **Animal Reproduction Science**, v.80, p.81–90, 2004.

CAHILL, LP; MARIANA, JC; MAULEON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates, **Journal of Reproduction and Fertility** v.55, p. 27-36, 1979.

CAHILL, L.P.; MAULÉON, P. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility** 58, p. 321-328, 1980.

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

CARATY, A.; LOCATELLI, A.; MARTIN, G.B. Biphasic response in the secretion of gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with estradiol. **Journal of Endocrinology**, v.123, p. 375-382, 1989.

CARATY, A.; DELALEU, B.; CHESNEAU, D.; FABRE-NYS, C. Sequential Role of E2 and GnRH for the Expression of Estrous Behavior in Ewes. **Endocrinology**, v.143: p.139–145, 2002.

CARSON, R.S.; FINDLAY, J.K. ;CLARKE, I.J. ;BURGER H.G. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.24(1), p. 105-113, 1981.

CASTONGUAY, F.; DUFOUR, J.J.; MINVIELLE, F.; ESTRADA, R. Follicular dynamics and dominance in boorola x finnish landrace and boorola x Suffolk ewes heterozygous for the f genes. **Journal of Reproduction and fertility**, v.89, p. 193-203, 1990.

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

CONN, P.M.; CROWLEY JR., W.F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs **Annals Review of Medicine**. v.45, p.391-405, 1994.

CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G.; CAIGUA, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALES-BULNES, A. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.47-55, 2008.

COY, D.H.; SCHALLY, A.V. Gonadotrophin releasing hormone analogues. **Annual Clinical Research**, v.10, p.139–144, 1978.

CRIGHTON, D.B.; FOSTER, J.P. Luteinizing hormone release after two injections of synthetic luteinizing hormone releasing hormone in the ewe. **Journal of Endocrinology**,. v.72, p.59–67, 1977.

CUMMING, I.A.; BUCKMASTER, J.M.; BLOCKEY, M.A.B.; GODING, J.R.; WINDFIELD, C.G.; BAXTER, R.W. Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.9, p.24–29, 1973

DIAS, L.M.K.; PAES DE BARROS, M.B.; SILVA, J.C.B.; OKABE, W.K.; ANJOS, J.; ANDRADE, J.C.O.; NICHI, M.; AYRES, H.; OLIVEIRA, C.A. Efeito do hCG na taxa de concepção de ovelhas receptoras. Congresso Brasileiro Reprodução Animal, v.18, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, p. 428, 2009.

DICKIE, A.M.; PATERSON, C.; ANDERSON, J.L.M.; BOYD, J.S. Determination of corpora lutea numbers in booroola-texel ewes using transrectal ultrasound. **Theriogenology**, v.51, p. 1209–1224, 1999.

DRIANCOURT, M.A; CAHILL L. P., Preovulatory follicular events in sheep, **Journal of Reproduction and fertility**, v.71, p. 205-211, 1984.

DRIANCOURT, M.A.; GAULD, I.K.; TERQUI, M.; WEBB, R. Variations in patterns follicle development in prolific breeds sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p. 565-575, 1986.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-79, 1991.

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

DUFOUR, J.; CAHILL, L.P.; MAULEON, P. Short-and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. **Journal of Reproduction and fertility**; v.57, p.301–309, 1979.

DUFOUR, J.J.; COGNIE, Y.; MERMILLOD, P.; MARIANA, J.C.; ROMAIN, R.F. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. **Journal Reproduction Fertility**, v.118: p.85-94, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1991. Fisiologia de la reproducción en ovejas y cabras. In:____. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Espanha: Acribia ed., p.95-107.

EVANS, N.P.; DAHL, G.E.; CARATY, A.; PADMANABHAN, V.; THRUN, L.A.; KARSCH, F.J. How much of the GnRH surge is required for generation of the LH surge in the ewe? Duration of the endogenous GnRH signal. **Endocrinology**, v.137, p.4730–4737, 1996.

EVANS, N.P.; DAHL, G.E.; GLOVER, B.H.; KARSCH, F.J. Central Regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. **Endocrinology**, v. 134, p.1806-1811, 1994.

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.

FRASER, H.M. Antifertility effects of GnRH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, p.503–515, 1982.

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

GINTHER, O.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v.42 ,p.987-1001, 1994.

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

GONZALES DE BULNES,A.;OSORO, K.; LOPEZ SEBASTIAN, A. Ultrasonographic assessment of the ovarian response in eCG-treated goats. **Small Ruminant Research**, v.34, p.65-69, 1999.

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

GOBELLO, C. New GnRH analogs in canine reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.1–13, 2007.

GÖKDAL, Ö.; ATAY, O.; ÜLKER, H. ; YARAL, E. ; HELVA, Í.B. ; DEAVILA, D.M. ; REEVES, J.J. GnRH or eCG treatment fails to restore reproductive function in GnRH immunized ewes. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.1-13, 2009.

GODING, J. R.; CAT, K. J.; BROWN, J. M.; KALTENBACH,C. C.; CUMMING, I. A.; MOLE, B. J. Radioimmunoassay for ovine luteinizing hormone. Secretion of luteinizing hormone during estrus and following estrogen administration in the sheep. **Endocrinology**, v.85, p.133-142, 1969.

GONZALEZ, F.H.D.; DA SILVA, S.C. Bioquímica Hormonal. In:____. **Introdução à Bioquímica na Clínica Veterinária**. 2006, 2 ed., UFRGS, p.251-312.

GORDON, I. Breeding sheep at younger ages. In: _____. **Controlled Reproduction in Sheep and Goats**. 1997.CAB, Slough, p.330–346.

GÜNGÖR, Ö; PANCARCI, S.M.; ÇENESIZ, M.; BECERIKLISOY, H.B.; KANCA, H. Effect of GnRH implant (deslorelin) with different formulation on fertility and delay of

oestrous cycle in ewes. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. v.51, p.25-29, 2007.

HAHN, D.W.; PHILLIPS, A.; LAI, M.T.; KLIMEK, S.; MCGUIRE, J.L. Potency and activity variation of LHRH analogs in different models and species. **Endocrinology Research** 10:123–138, 1984.

HUDSON, N.; O'CONNELL, A.R.; SHAW, L.; CLARKE, I.J.; MCNATTY, K.P. Effect of exogenous FSH on ovulation rate in homozygous carriers or noncarriers of the booroola FecB gene after hypothalamic-pituitary disconnection or after treatment with a GnRH agonist. **Domestic Animals Endocrinology**, v.16(1), p.69-80, 1999.

KARACA, F.; ATAMAN, M.B.; ÇOYAN, K. Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes. **Small Ruminant Research**, v.81, p.185–188, 2009.

KARSCH, F.J.; DAHL, G.E.; EVANS, N.P.; MANNING, J.M.; MAYFIELD, K.P.; MOENTER, S.M. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol, **Biology of Reproduction**, v.49, p. 1377–1383, 1999.

KARTEN, M.J.; RIVIER, J.E. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. **Endocrinology Review**, v.7: p.44–66, 1986.

KEISLER, D.H.; KEISLER, L.W. Formation and function of GnRH-induced subnormal corpora lutea in cyclic ewes. *Journal Reproduction Fertility*. v.87, p.267-273, 1989.

KHAN, T.H.; HASTIE, P.M.; BECK, N.F.G.; KHALID, M. hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.81–89, 2003.

Kim, S. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. **Fertility Sterility** v.85(1), p.1-11, 2006.

KAYNARD, A.H.; MALPAUX, B.; ROBINSON, J.E.; WAYNE, N.L.; KARSCH, F.J. Importance of pituitary and neural actions of estradiol in induction of the luteinizing hormone surge in the ewe. **Neuroendocrinology**, v.48, p.296–303, 1988.

LEITE, E. R. Ovinocaprinocultura no nordeste – organização e crescimento. **EMBRAPA Artigos Técnicos**. 2000. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/artigo14.htm>> Acesso em: 28 de Novembro de 2009.

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

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

LLEWELYN, C.A.; PERRIE, J.; LUCKINS, A.G.; MUNRO, C.D. Oestrus in the British white goat: timing of plasma luteinizing hormone surge and changes in behavioural and vaginal traits in relationship to onset of oestrus. *British Vet. J.* 149:171–182, 1993.

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

MCNATTY, K.P.; HEATH, D.A. ;LUNDY, T. ;FIDLER, A.E.;QUIRKE, L. Control of early ovarian follicular development **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.3-16, 1999.

MCNEILLY, A.S.; FRASER, H.M. Effect of GnRH agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. **Journal of Endocrinology**, v.115, p.273-282, 1987.

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

MONTGOMERY, G.W.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.; MCNATTY, K.P. Genes controlling ovulation rate in sheep, **Reproduction**,v.121,p. 843–852, 2001.

MOENTER, SM; CARATY, A.; KARSCH, F.J. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, 127:1375–1384, 1990.

MURBER, A.; FANCSOVITS, P.; LEDÓ, N.; GILÁN, Z.T.; RIGÓ JR., J.; URBANCSEK, J. Impact of GnRH analogues on oocyte/embryo quality and embryo development in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles: a case control study. **Reproduction, Biology and Endocrinology**, v.103(7), p.1-8, 2009.

NOEL, B.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.99, p.695-700, 1993.

OLDHAM, C.M.;KNIGHT, T.W.; LINDSAY, D.R. Comparison of the effects on reproductive performance in sheep, two methods of the estimation of ovulation rate. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.16, p.24-27, 1976.

PADULA, A.M. GnRH analogues – agonists e antagonists. **Animal Reproduction Science**, 88:155-126, 2005.

PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Reproductive responses of early postpartum dairy cattle to continuous treatment with a GnRH agonist (deslorelin) for 28 days to delay resumption of ovulation. **Animal Reproduction Science**, 70:23–36, 2002.

PICTON, M.; TSONIS, C. G.; MCNEILLY, A. S. FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. **Journal Endocrinology**, 126:297-307, 1990.

PHILLIPS, D.J.; CUMMINS, J.T.; CLARKE, I.J. Effects of modifying gonadotropin releasing hormone input before and after the oestrogen-induced LH surge in

ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection. **Journal of Endocrinology**, v.127, p.223–233, 1990.

QUIRKE, J.F.; HANRAHAN, J.P., GOSLING, J.P. Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.61, p.265-272, 1981.

RAHAMANIAN, M.S.; MURDOCH, W.J. Function of ovine corpora lutea after administration of luteinizing hormone-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, 64:648-655, 1989.

REEVES, J.J.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A.V. Changes in Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Anestrous Ewes Pretreated with Estradiol Benzoate. **Biology Reproduction**, v.4, p.88-92, 1971.

REYNA, J.; THOMSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Sincrony of ovulation and follicular dynamics in merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.4, p. 410-417, 2007.

RIPPEL, R. H.; MOYER, R. H.; JOHNSON, E. S.; MAUER, R. E. Response of the Ewe to Synthetic Gonadotropin Releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v.38, p.605-612, 1974.

RUBIANES, E.; BEARD, A.; DIERSCHKE, D.J.; BARTLEWSKI, P.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF 2 α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. **Theriogenology**. v.48, p.1093-1104, 1997a.

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

RUBIANES, E. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños ruminantes y su aplicación para el manejo reproductivo. **Actas de Fisiología**, v.6, p.93-103, 2000.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . **Animal Reproduction Science**, v.78, p.47-55, 2003.

SANTOS, J.E.P.; BARTOLOME, J.A.; CERRI, R.L.A.; JUCHEM, S.O.; HERNANDEZ, O.; TRING, T.; THATCHER, W.W. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. **Theriogenology**. v.61(2-3), p.421-435, 2004.

SCARAMUZZI, R. J.; CALDWELL, B. V.; MOOR, R. M. Radioimmunoassay of LH and estrogen during the estrous cycle of the ewe. **Biology of Reproduction**, v.3(1), p.110-119, 1970.

SCHENEIDER, F.; TOMEK, W.; GRÜDKER, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: an review. **Theriogenology**, v.66, (4), p.691-709, 2006.

SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1133-1140, 1993.

SENGER, P. L. Regulation of Reproduction – Nerves, Hormones and Target Tissues. In: _____. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2003. 2 ed. Moscow: Current conceptions, Inc, p.102-127.

SIMPLÍCIO, A. A.; WANDER, A. E.; LEITE, E. R. Caprino e Ovinocultura uma alternativa a geração de emprego e renda. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5 e CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA, 3. 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, p.146-147, 2003.

TAKADA, L.; BICUDO, S.D.; RODRIGUEZ, C.F.C.; LENZ, F.F.; BIANCHINI, D. Avaliação dos momentos de início de estro e da ovulação em ovelhas sulffolk submetidas a protocolo de curta duração para a sincronização do estro na pré-estação reprodutiva. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.27(3), p.475-477, 2003.

THIÉRY, J.C.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domestic Animals Endocrinology** v.23, p.87–100, 2002.

TURK, G.; GUR, S.; BOZKURT, T.; AKSU, E.H.; AKSOY, H. Effect of exogenous GnRH at the time of artificial insemination on reproductive performance of Awassi ewes synchronized with progestagen-PMSG-PGF2alfa combination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.308–313, 2008.

VALIENTE, C.; CORRADA, Y.; DE LA SOTA, P.E.; BLANCO, P.G.; ARIAS, D.; GOBELLO, C. Comparison of Two Doses of the GnRH Antagonist, Acyline, for Pregnancy Termination in Bitches. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44(2), p.156–159, 2009.

VICKERY, B.H.; MC RAE, G.I.; GOODPASTURE, J.C.; SANDERS, L.M. Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.175–187, 1989.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. **Animal Reproduction Science** v.80, p. 69-79, 2004.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v. 53, p. 95-112,1998.

WHITMORE, D. L.; BECHERT, U. S.; ROWE, K. E.; STORMSHAK, F. Luteal Function in Unilaterally Hysterectomized Ewes Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone. **Journal of Animal Science**, v.74:1930-1935, 1996.

WILMUT, I.; SALES, D.I.; ASHWORTH, C.J. 1986. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. **Journal Reproduction Fertility**, v.76, p.851–864, 1986.