UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
***CAMPUS* DE JABOTICABAL**

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO LH AO FINAL DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO NA TAXA DE OVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Maria Emilia Franco Oliveira

Médica Veterinária

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
***CAMPUS* DE JABOTICABAL**

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO LH AO FINAL DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO NA TAXA DE OVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Maria Emilia Franco Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, *campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2008

Oliveira, Maria Emilia Franco
O48e Efeito da administração do LH ao final do tratamento superestimulatório na taxa de ovulação e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês / Maria Emilia Franco Oliveira. – – Jaboticabal, 2008
xiii, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Paulo Henrique Franceschini, Luiz Fernando de Souza Rodrigues
Bibliografia

1. Superovulação. 2. Indução da ovulação. 3. LH. 4. Embriões. 5. Ovinos. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619;612.621.9:636.3

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA - filha de Zilmar Morais de Oliveira e Suely Andrade Franco Oliveira, nascida em 22 de outubro de 1980, na cidade de Ituiutaba, Minas Gerais, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA (antiga Faculdade de Ciências Agrárias do Pará - FCAP), em 13 de maio de 2005, na cidade de Belém - PA. Coordenou pesquisas no Centro de Pesquisa de Caprinos e Ovinos do Pará, pertencente à mesma universidade no período de junho de 2005 a fevereiro de 2006. Em março do ano seguinte ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração: Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", *campus* de Jaboticabal – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente.

Dedico,

Aos meus queridos pais e irmãos,

por todo amor, apoio e dedicação incondicionais que me fortalece e me faz seguir em busca dos "nossos" sonhos.

"O tempo não é algo que possa voltar para trás,
portanto, plante seu jardim em vez de esperar
que alguém lhe traga flores.
E você aprenderá que realmente pode sonhar,
acreditar, lutar e poderá ir muito mais longe
depois de pensar que não se pode ir mais.
E a vida realmente terá valor e você terá valor
diante da vida.
Ser feliz hoje é nossa maior obrigação .... "

Adaptado de Willian Shakespeare

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Ao Professor Dr. **Wilter Ricardo Russiano Vicente**, por ter confiado nas poucas referências que recebeu e ter me permitido ser sua orientada. Hoje certamente conhece um pouco mais de mim, e acompanhou o grande crescimento intelectual que tive durante esse período. Obrigada por todo apoio, confiança em meu trabalho e pelas palavras sempre sábias e amorosas.

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP** – através da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao **Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária** pela oportunidade de realizar um mestrado de nível reconhecido em todo o país.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao casal, **Fabio Pinto da Costa** e **Daniele Campos Araújo da Costa** por abrirem as "porteiras" da Fazenda Betel permitindo a execução deste experimento e de tantos outros que contribuíram para meu aprendizado no decorrer desse mestrado. Agradeço imensamente por toda a confiança, apoio e amizade.

Aos **funcionários da Fazenda Betel** que sempre estiveram de prontidão para me auxiliar, possibilitando a execução de nossos trabalhos, o meu muito obrigada.

A empresa **Tecnopec** e em especial a Dra. **Isabel Santos** por toda confiança e apoio no desenvolvimento desse e outros projetos. Obrigada pelos patrocínios e especialmente, pelas orientações sempre importantes para aprimoramento dos nossos trabalhos.

Ao médico veterinário **Pablo Paiva**, em nome de quem agradeço o apoio da empresa **Pfizer**, pelo patrocínio oferecido para execução desse e de outros experimentos.

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

A todos os **professores da UNESP - FCAV** que tive o prazer de conviver, dividindo conhecimentos e experiências. Especialmente aos Professores: **Izabelle Auxiliadora Molina de Almeida Teixeira, Kleber Tomás de Resende e Márcia Rita Pacheco,** que abriram "as portas e os braços" possibilitando a realização de vários trabalhos em conjunto. Vocês me proporcionaram grandes aprendizados. Obrigada pela confiança!

Ao Professor **Gener Pereira**, agradeço pela disponibilidade na execução da análise estatística deste trabalho.

Aos Professores e amigos **Rosângela Zacarias Machado** e **Célio Raimundo Machado**, os meus agradecimentos por todo atenção, proteção e apoio que me deram desde a chegada a Jaboticabal. Obrigada por estenderem a mim a amizade e carinho que têm com meu pai.

Aos queridos amigos do Departamento de Reprodução Animal: Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida, Paulo Sérgio da Silva, Isabel Aparecida Penharol Natarelli, Roberta Machado Ferreira, Mabel Freitas Cordeiro, Marcelo Barbosa

Bezerra, Michelly Fernandes de Macedo, Danilas Salinet de Melo, Naiara Zoccal Saraiva, Max Vitório Resende, Ana Paula Perini, Aline Costa de Lúcio, Juliana Corrêa Borges, Márcio Ribeiro Silva, Rubia Bueno da Silva, Lourival Paz Landim, Juliana Pieroni, Clara Slade Oliveira, Letícia Zocolaro de Oliveira, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, Kellen de Sousa Oliveira, Fernanda Patrícia Gottardi, Eliana Cristina Gazoto, Felipe Perecin, Christina Ramires Ferreira, Erlon Gomes de Oliveira Júnior, Fábio, Aracélle Elisane Alves, Maricy Apparicio Ferreira, Janaina Torres Carreira, Frederico Ozanam Barros Monteiro, Eveline Zanetti, Bruna, o meu muito obrigado pelo convívio, alegria, simpatia e coleguismo que tornaram nosso ambiente de trabalho tão agradável. Muito obrigada de modo especial a cada um, pelas diversas colaborações em meus trabalhos. Agradeço ainda pelos inúmeros momentos de lazer de tivemos juntos.

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

Aos colegas e amigos do Departamento de Zootecnia, especialmente do Setor de Caprinos, o meu muito obrigado pelo convívio, ensinamentos e pelas grandes parcerias.

Aos professores da Universidade de São Paulo - USP, especialmente a: **Mayra Elena Ortiz DÀvila Assumpção, José Antonio Visintin e Ed Hoffmann Madureira**, agradeço por todo carinho, atenção e pelas experiências e conhecimentos transmitidos durante nosso convívio. Ao **Pietro Sampaio Baruselli,** também dessa instituição, quero agradecer não só pelos ensinamentos transmitidos durantes as disciplinas e palestras. Ao senhor agradeço pela presteza, sugestões e indicações que contribuíram imensamente durante a idealização desse experimento.

Ao **professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *Campus* Botucatu**, que tive o prazer de conviver mesmo que por curtos períodos, mas que me proporcionaram durantes as disciplinas cursadas nesta instituição, momentos de grandes aprendizados.

Ao Professor Dr. **Luiz Fernando de Souza Rodrigues**, agradeço pela confiança em meu trabalho desde a execução da minha monografia de graduação, e por toda a atenção e carinho que sempre me demonstrou, tornando um grande amigo e parceiro de inúmeros projetos.

Ao Dr. **Jeferson Ferreira da Fonseca**, pesquisador da EMBRAPA, agradeço as inúmeras conversas que contribuem sempre para meu aprendizado e a presteza com que sempre me tratou.

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

À minha querida amiga "Meibol Cocero" - **Mabel Freitas Cordeiro**, que abriu os braços e me acolheu com tanto carinho assim que cheguei. Sua solidariedade, simplicidade, força e dedicação me conquistaram. É muito bom saber que posso contar com você para tudo. Seremos sempre grandes amigas e parceiras de trabalhos.

À minha amiga-irmã, **Roberta Machado Ferreira**, pela imensa amizade que construímos nesse período. Inicialmente descobrimos e nos divertimos com as imensas semelhanças, em seguida conquistamos e juntas realizamos vários projetos profissionais e pessoais, logo depois fomos separadas momentaneamente, mas isso me mostrou que não foi por acaso que nos cruzamos,

nossa amizade nunca vai acabar. Muito obrigada por todos os momentos de alegria e por contribuir muito ao meu crescimento. Agradeço também a sua família por ter me acolhido com tanto carinho.

Ao meu querido amigo, **Samuel Figueiredo de Souza**, por ter me possibilitado desenvolver vários "projetos paralelos". Você além de um grande parceiro de trabalho tornou-se um verdadeiro amigo. Juntos, mostramos que é possível trabalhar com responsabilidade e muita alegria.

Ao casal de amigos **Michelly Fernandes de Macedo** e **Marcelo Barbosa Bezerra**, que sempre me acolheram com carinho e me ajudaram sempre que precisei. Obrigada por tudo!

Ao amigo **Henderson Ayres**, que me conquistou pelo jeito alegre, carinhoso e "sempre implicante". Obrigada pelo apoio e ensinamentos que sempre me ajudaram.

Ao amigo **Frederico Ozanan Barros Monteiro**, pela indicação desta universidade para a realização do meu mestrado. Obrigado por todo o carinho.

A querida **Deborah Penteado Martins Dias**, a famosa *Derby*, sempre gentil, carinhosa e divertida. Desde o primeiro instante gostei muito de você.

Às moradoras da **"Republica Bão Tamén"**, agradeço pela convivência sempre harmoniosa e feliz. Robertinha e Juliana Silva Lopez, juntas fundamos essa república para consagrar nossa amizade e nosso lar. Hoje, a republica aumentou, temos mais uma integrante, Ludmilla Bertonha de Martini. Meninas! É muito bom saber que ao voltar para casa encontrarei vocês, queridas amigas, mesmo que isso seja de vez em quando. Obrigada por tudo!!

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

Muito obrigada a todos! Que Deus os abençoe sempre!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS.....iii

LISTA DE TABELAS v

LISTA DE FIGURAS vii

RESUMO viii

SUMMARY ix

1. INTRODUÇÃO.....1

2. REVISÃO DE LITERATURA.....2

3. OBJETIVOS 8

3.1. Geral 8

3.2. Específicos 8

4. MATERIAL E MÉTODOS.....9

4.1. Local do experimento 9

4.2. Animais 9

4.3. Tratamentos.....10

4.4. Avaliação ultra-sonográfica 11

4.5. Observação de estro.....13

4.6. Inseminação artificial.....13

4.7. Avaliação laparoscópica.....14

4.8. Colheita de embriões 15

4.9. Avaliação embrionária 16

4.10. Análise Estatística.....17

Página

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 18

5.1. Avaliação da condição folicular no início do tratamento superestimulatório 18

5.2. Avaliação da manifestação de estro..... 21

5.2. Resposta superestimulatória e período ovulatório 23

5.4. Resposta superovulatória e produção de embriões 26

6. CONCLUSÕES..... 36

7. REFERÊNCIAS 37

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CIDR	“Controlled internal drug release”
CL	Corpo Lúteo
cm	Centímetros
D	Dia
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
FG	Folículo Grande
FGA	Acetado de fluorogestona
FPO	Folículo Pré-ovulatório
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FSHp	Hormônio folículo-estimulante de origem suína
G	Gauge (medida de diâmetro de uma agulha)
g	Grama
h	Hora
IA	Inseminação Artificial
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
L	Litro
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mg	miligramas
mg/Kg	Miligrama por kilograma
MHZ	Mega-Hertz
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embriões
nº	Número
ºC	Graus Celsius

PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PGF2α	Prostaglandina F2α
rpm	Rotações por minuto
SAS™	Statistical Analyses System
UI	Unidade internacional
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ovelhas submetidas a tratamento de superovulatório e colheita de embriões (FCAV, *campus* de Jaboticabal, UNESP / 2008)..... 10

Tabela 2 - Classificação dos embriões quanto à qualidade (FCAV, *campus* de Jaboticabal, UNESP / 2008)..... 17

Tabela 3 - Médias e desvio padrão do diâmetro dos folículos maiores (F1 e F2) e número de folículos com diâmetro de aproximadamente 2 mm presentes no início do tratamento superestimulatório com FSH de acordo com a categoria e número médio de folículos ovulatórios no momento da inseminação artificial (FCAV, *campus* de Jaboticabal, UNESP / 2008)..... 20

Tabela 4 - Distribuição da freqüência, média ± desvio padrão de folículos grandes (FG), pré-ovulatórios (FPO), ovulados e corpos lúteos avaliados no momento da primeira e segunda inseminação artificial (IA) e folículos anovulatórios e corpos lúteos avaliados durante colheita de embriões nos diferentes grupos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 24

Tabela 5 - Percentual de ovelhas que ovularam nos diferentes períodos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 26

Página

Tabela 6 - Distribuição da freqüência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média ± desvio padrão do número de corpos lúteos (CL) em cada categoria (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 27

Tabela 7 - Índices da resposta superovulatória e da produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação suplementado ou não com LH (FCAV - *campus* Jaboticabal - UNESP, 2008)..... 33

LISTA DE FIGURAS **Página**

Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação (G-C e G-LH) de ovelhas Santa Inês doadoras de embriões (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 12

Figura 2. Histograma da distribuição das ovelhas em estro conforme o intervalo entre a retirada do implante de progesterona e início do estro (horas). (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 22

Figura 3 - Imagens obtidas por laparoscopia. **A** - Ovário contendo folículos pré-ovulatórios; **B** - Ovário contendo folículos grandes (a) e ovulados (b); **C** - Ovário contendo corpos lúteos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 25

Figura 4 - Histograma do número de corpos lúteos presentes no dia da colheita de embriões em função dos animais experimentais nas duas réplicas (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 28

Figura 5 - Histograma do número de corpos lúteos em função dos animais experimentais nos diferentes grupos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 29

Figura 6 - Histograma do número de folículos anovulatórios em função dos animais experimentais nos diferentes grupos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 31

Figura 7 - Fotografia ilustrando a ligação entre os ovários, esquerdo (OE) e direito (OD) de uma ovelha e os corpos lúteos (CL) no dia da colheita de embriões (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008)..... 32

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO LH NO FINAL DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO NA TAXA DE OVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

RESUMO - Foram realizados 20 programas de superovulação e colheita de embriões em ovelhas Santa Inês, com objetivo de testar a hipótese que a adição de LH ao final do protocolo de superovulação causa incremento nas taxas de ovulação e de produção de embriões. Para tanto, o experimento foi delineado em *cross-over*, sendo o estro sincronizado com CIDR™ por 14 dias. No D7, substituiu-se o implante por um novo, e administrou-se 37,5 µg de d-cloprostenol, IM. Para superestimulação, 256 mg de FSHp foram administradas em 8 doses decrescentes, iniciando no D12. No D14, as fêmeas receberam 200 UI de eCG e 37,5 µg de d-cloprostenol. No grupo controle (G-C) a taxa FSH/LH foi constante, enquanto no G-LH o protocolo preconizava o acrescido de 7,5 mg de LH, administrado 24 h após a retirada do implante (D15). As fêmeas foram inseminadas com sêmen congelado, por laparoscopia, as 42 e 48 h após a retirada do implante, concomitantemente, as estruturas ovarianas foram avaliadas. No D21, os embriões foram cirurgicamente colhidos e avaliados. Os resultados demonstraram que o LH administrado ao final do tratamento superovulatório não incrementou de maneira significativa a taxa de ovulação e o número de embriões viáveis (78,7% ± 22,72 e 3,77 ± 4,29, respectivamente, G-C; 84,75 ± 10,13 e 4,22 ± 5,19, G-LH). Quanto ao período das ovulações, observou-se grande distribuição nos grupos, sendo possivelmente correlacionado ao grande número de estruturas não fecundadas e embriões degenerados encontrados. A ausência de diferença estatística no número de corpos lúteos, de embriões recuperados e viáveis pode ser associada à grande variabilidade individual.

Palavras-chave: Superovulação; indução de ovulação; LH; embriões; ovinos.

FFECTS OF LH ADMINISTRATION AT END OF THE FSH SUPEROVULATORY REGIMEN ON OVULATION RATE AND EMBRYO PRODUCTION IN SANTA INÊS SHEEP

SUMMARY - Twenty superovulation programs and embryos recovery were accomplished in Santa Inês sheep, with objective to test the hypothesis that addition of LH at the end of the superovulatory regimen causes an increase in the ovulation rate and of embryos production. For so much, the experiment was delineated in cross-over, being the estrus synchronized with CIDR, for 14 days. On D7, the implant was substituted by a new one, and 37.5 µg of d-cloprostenol were administered. Then, 256 mg of FSHp were administered in 8 decreasing doses, starting on D12. On D14, all females received 200 IU of eCG and 37.5 µg of d-cloprostenol. In control group (G-C), the FSH/LH ratio was constant, while in G-LH 7.5 mg of LH, administered 24 h after implant withdrawal (D15). The laparoscopic inseminations occurred 42 and 48 h after implant withdrawal, concomitantly, the evaluated ovarian structures. On D21, the embryos were surgically collected and evaluated. Overall, the results showed that LH administration at the end of the FSH treatment did not significant increase the ovulation rate and number of viable embryos (78.7% ± 22.72 and 3.77 ± 4.29, respectively, G-C; 84.76 ± 10.14 and 4.22 ± 5.22, G-LH). For the period of the ovulations, a great distribution was observed inside of the groups, being correlated possibly to the great number of unfertilized oocytes and degenerated embryos. The no statistical difference in the number of corpus luteum, embryos recovery and viability can be associated the great individual variability.

Keywords: Superovulation; ovulation induction; LH; embryos; ovine

1. INTRODUÇÃO

A eficiência dos tratamentos para múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) em ovelhas é ainda afetada por alta variabilidade na resposta ovulatória à estimulação com hormônio folículo estimulante (FSH) exógeno, entre grupos de tratamentos e animais de um mesmo grupo (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2004). O rendimento desta técnica é baixo pela presença de fêmeas que não ovulam ou apresentam baixa resposta ovulatória, o que correspondem de 20 - 30% (COGNIÉ, 1999; GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2000). Possíveis causas foram inicialmente atribuídas a desordens induzidas pelos tratamentos superovulatórios, no eixo endócrino e folículos ovarianos (MORR *et al.*, 1985). Assim, podendo ser relacionadas à deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2003) ou a presença de folículos não responsivos, devido à baixa expressão dos receptores de LH da granulosa e da teca (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992; BOLAND *et al.*, 1991). Essas alterações usualmente levam as anormalidades ovulatórias, tais como folículos anovulatórios e folículos não ovulados luteinizados (KAFI *et al.*, 1997).

COGNIÉ *et al.* (1986) sugeriram que a administração de LH ao término da estimulação com FSH exógeno pudesse aumentar a taxa de ovulação e o número de embriões recuperados. Neste sentido, PICAZO *et al.* (1996) verificaram apenas tendência de incremento nas taxas de ovulações e recuperação embrionária, embora observando freqüência aumentada de ovelhas Manchega, Churra e Merina que responderam com múltiplas ovulações e decréscimo na taxa de folículos anovulatórios. Estes aumentos, como em bovinos, podem diferir entre genótipos (CHUPIN *et al.*, 1985). Desta forma, ainda não é possível predizer as alterações nas taxas de ovulação e produção de embriões, relacionadas à administração de LH ao final do protocolo de superestimulação em ovelhas da raça Santa Inês que demonstram papel importante na consolidação dessa biotecnologia no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A transferência de embriões baseia-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da inseminação artificial e da colheita dos embriões através da lavagem uterina, preferencialmente, entre o quinto e sexto dia após o início do estro e posterior transferência a fêmeas receptoras com a finalidade de complementarem o período de gestação (REICHENBACH *et al*., 2002).

As possibilidades que oferece a transferência de embriões como método de progressão rápida do número de descendentes de uma determinada fêmeas tem grande interesse tanto do ponto vista básico, na investigação sobre o desenvolvimento embrionário como do aspecto prático de produção animal (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). O incremento do número de descendentes por fêmea faz dessa técnica um instrumento de progresso genético, por aumentar a pressão de seleção e ainda, reduzir o intervalo entre gerações pela obtenção de embriões de fêmeas jovens. Entre outras aplicações, fornece base técnica para implantação de outras biotecnologias afins; possibilita a preservação de animais em risco de extinção e facilita trâmites comerciais de importação e exportação de material genético por garantia sanitária (BARIL *et al*., 1995).

A primeira transferência de embriões ovinos foi documentada por WARWICK *et al*. (1934) nos Estados Unidos. Já no Brasil o primeiro relato foi feito por SELAIVE & MIES FILHO (1979) com o nascimento de três borregos oriundos de transferência de embriões a fresco no estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, a transferência de embriões em ovelhas é uma realidade. Levantamento mundial do biênio 2004-2005 revela a transferência de aproximadamente 84.943 e 34.458 embriões ovinos, respectivamente. Todavia, os dados demonstram um decréscimo no número de embriões ovinos (- 47 %) coletados em detrimento da elevação no número de embriões caprinos (+ 293 %) (FONSECA *et al*., 2007). A ausência de controles oficiais e de comunicações de profissionais e associações pode fazer com que estes dados estejam sendo subestimados. De qualquer forma, o volume de embriões congelados cresceu substancialmente para as duas espécies (FONSECA *et al*.,

2007). Parcialmente, isto pode ser resultado do crescimento mundial dos rebanhos caprino e ovino (HAENLEIN, 2004), espécies que têm movimentado considerável volume de intercâmbio genético (i.e. embriões e sêmen).

O sucesso da transferência de embriões depende do manejo sanitário e nutricional das fêmeas, sincronismo de estro entre doadoras e receptoras, resposta superovulatória das doadoras, inseminação artificial, coleta, avaliação e transferência dos embriões e fatores que afetam a sobrevivência dos embriões transferidos (ISHWAR & MEMON, 1996).

A sincronização do estro é efetivamente alcançada pela redução da fase lútea através da indução da luteólise pela prostaglandina F 2α (MENCHACA *et al.*, 2004), ou por seu prolongamento pelo uso de progesterona ou progestágenos (HASHEMI *et al*., 2006). A eficiência da sincronização do estro com progestágenos conduz a baixa taxa de concepção quando comparada ao estro natural, devido a alterações no padrão de liberação de LH (GORDON, 1975; SCARAMUZZI *et al*., 1988), na qualidade das ovulações (KILLIAN *et al*., 1985) e no transporte e sobrevivência espermática (HAWK & CONLEY, 1971). Desconsiderando tais inconveniências, os protocolos com progestágenos são os principalmente utilizados na prática para sincronização de estro e sua utilização foi estendida a outras técnicas da reprodução assistida, como a superovulação e transferência de embriões.

O efeito de diferentes tempos de exposição a implantes de progesterona ou progestágenos na subseqüente taxa de ovulação e qualidade dos embriões em ovelhas superovuladas tem sido estudado. Baixa taxa de embriões viáveis tem sido reportada em ovelhas sincronizadas com apenas um “Controlled Internal Drug Release” (CIDR) e superovulada com FSH exógeno (THOMPSON *et al*., 1990). Entretanto, quando um segundo CIDR é inserido no Dia 7 (GUSMÃO, 2006) ou Dia 9 (Dia 0 início do protocolo) (THOMPSON *et al*., 1990) ou o pessário de acetado de fluorogestona (FGA) é suplementado com progesterona (SCUDAMORE *et al*., 1993) mais embriões transferíveis são obtidos. Suportando o conceito que concentrações altas de esteróides são desejáveis (SCUDAMORE *et al*., 1993). Dessa forma, RUBIANES *et al*. (1999) sugeriram que se a progesterona é efetivamente importante

na subseqüente resposta superovulatória, esse efeito é provavelmente mais relacionado a uma ação prévia do hormônio na dinâmica folicular que em sua concentração durante o período de estimulação gonadotrófica.

O objetivo de um tratamento destinado a aumentar a taxa de ovulação e o número de embriões obtidos implica, no aumento do número de folículos pré-ovulatórios mediante aporte de altas doses de gonadotrofinas exógenas. No começo se utilizou, como agente estimulatório, a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) em uma só dose, normalmente de 1500 UI, mediante injeção por via intramuscular, 48 horas antes da retirada do progestágeno (RAINIO, 1991). Atualmente, o eCG não é utilizado isoladamente em protocolos de superovulação por promover alta taxa de folículos anovulatórios, que se luteinizam (YING & MEYER, 1969), efeito dependente da dose, momento de aplicação e vida média do preparado comercial (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). Grande melhoria na eficiência em programas de superovulação para produção *in vivo* de embriões tem sido observada nas últimas três décadas pela substituição do eCG por preparados de FSH geralmente de origem porcina (ARMSTRONG & EVANS, 1983; JABBOUR & EVANS, 1991). Com este hormônio se obtém taxas de ovulações superiores e menor incidência de folículos anovulatórios, obtendo resposta individual mais uniforme (ARMSTRONG & EVANS, 1983). No entanto, para estimular adequadamente os ovários é necessário administrá-lo com intervalo de 12 horas (CHUPIN & PROCUREUR, 1985), devido suas concentrações na circulação periférica decrescerem a concentrações basais em 10 horas (DEMOUSTIER *et al.*, 1988). Os melhores resultados são obtidos iniciando o tratamento 48 horas antes da retirada do progestágeno, com injeções diárias em doses decrescentes (HOFFMAN *et al.*, 1988), durante 2 - 4 dias (LÓPEZ SEBASTIÁN *et al.*, 1991; COGNIÉ, 1999). Resultados apresentados por D`ALESSANDRO *et al*. (2005) sugerem que tratamentos hormonais mais longos com FSH-p e combinados com uma relação FSH/LH variável durante o período pré-ovulatório promovem desenvolvimento de um maior número de folículos ovulatórios. Em geral, o FSH exógeno começa a atuar sobre a população de folículos presente nos ovários das ovelhas entre 12 e 24 horas após o início do tratamento. A partir

desse momento, decorridas 48 horas, se observa crescimento de folículos de 2 mm a 5 mm. Os folículos em crescimento alcançam o tamanho pré-ovulatório entre 36 e 60 horas, concentrando-se entre 48 e 60 horas. (GONZÁLEZ-BULNES *et al*., 1997).

Na produção *in vivo* de embriões, independentemente dos hormônios utilizados no tratamento superovulatório, do protocolo de administração, do método de sincronização das ovulações, as maiores limitações responsáveis pela variabilidade das respostas estão relacionadas com a dinâmica folicular, com o equilíbrio estímulo-inibição que determinam à taxa de ovulação em cada espécie, e com os mecanismos intra-ovarianos que controlam o crescimento folicular (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). Dessa forma, estudos assinalam que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório favorece a resposta ao tratamento, na existência de um alto número de folículos de tamanho médio capazes de crescer até o tamanho ovulatório na ausência de um folículo dominante (BUNGARTZ & NIEMMAN, 1994; KOHRAM *et al*., 1995). Assim, RUBIANES *et al*. (1997) observaram inicialmente maior resposta estimulatória quando o tratamento gonadotrófico inicia no dia da ovulação (Dia 0). Entretanto, após 72 horas do tratamento, os mesmos autores verificaram que o número de folículos grandes é similar entre fêmeas com início da estimulação no dia 0 e 3, demonstrando que o FSH exógeno tem efeito de anular a supressão do folículo dominante sobre os subordinados. Porém é ainda, associada a uma baixa habilidade de ovulação, a formação de corpo lúteo anormal e a baixa competência de desenvolvimento do oócito, supostamente por promover o desenvolvimento de folículos que já iniciaram o processo de atresia ou ovulação de folículos envelhecidos que possuem oócitos que retomaram prematuramente a meiose.

A formação de corpos lúteos anormais e com período de vida curto parece ser prevalente em ovelhas superestimuladas (RUBIANES *et* al., 1995). Tal evento possivelmente é decorrente do desenvolvimento de folículos com capacidade inadequada de formação luteal (KEISLER *et al*., 1989; WHITE *et al*., 1987) ou pela ativação prematura do mecanismo de luteólise (BAIRD, 1992; HUNTER, 1991). Essa alta incidência de corpos lúteos anormais em ovelhas superestimuladas pode estar

correlacionada à presença de folículos maiores que 4 mm no início do tratamento ou mesmo a quantidade ou característica do hormônio utilizado no tratamento superestimulatório. Para RUBIANES *et al.* (1995) em uma mesma ovelha todos os corpos lúteos são normais ou subnormais, indicando mecanismo geral ou sistêmico. Inibidores da prostaglandina-sintetase como a Flunixin meglumine administrado de uma a duas vezes ao dia, entre o 2º e 4º dia após a detecção do estro (período crítico), auxiliam no bloqueio do processo de regressão prematura dos corpos lúteos. Neste sentido, trabalhos práticos têm observado incremento na recuperação de embriões viáveis, possibilitando o desenvolvimento de programas de transferência de embriões (TRALDI, 2002).

Outros aspectos importantes na produção *in vivo* de embriões se referem à diminuição da resposta à superestimulações repetidas, devido às concentrações de anticorpos anti-FSH e às falhas de fecundação em fêmeas de alta resposta superovulatória, (COGNIÉ, 1999; LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). Segundo EVANS & ARMSTRONG (1984), tratamentos superovulatórios promovem prejuízo no transporte espermático ao útero e oviduto pela cérvix. Assim, a inseminação intra-uterina pode incrementar a taxa de fecundação, principalmente em ovelhas com um alto número de ovulações, levando a uma influencia positiva na produção de embriões. Por outro lado, a taxa de fecundação pode ser relacionada ao protocolo de administração da gonadotrofina (FSH), possivelmente por afetar a qualidade dos oócitos pela alteração do ambiente do oviduto e uterino, assim levando a subseqüente degeneração de alguns embriões (D`ALESSANDRO *et al*., 2005).

O tratamento superovulatório com FSH promove ainda, grande variabilidade que é atribuída ao efeito negativo do LH presente nos preparados comerciais utilizados, que pode apresentar diferenças na relação entre FSH e LH entre lotes (CHUPIN *et al*., 1985), desde 20 a 80% (LINDSELL *et al*., 1986). Uma alta atividade de LH diminui a resposta ovariana (MURPHY *et al*., 1984), por isso, atualmente se utilizam preparados de FSH altamente purificados (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). Em bovinos, a diminuição dessa relação FSH/LH, aumenta o número de ovulações em

algumas raças, enquanto em outras mostram diminuição (CHUPIN *et al.*, 1985). Este fato enfatiza a importância de diferenças raciais na resposta as gonadotrofinas.

Pouco se sabe do efeito de modificar a relação FSH/LH em tempos específicos durante tratamento superovulatórios. Nas fases finais de crescimento folicular, há uma sensibilidade aumentada ao FSH e LH (MC NATTY *et al.*, 1990). Baseado na concepção que a relação FSH/LH em condições fisiológicas decresce do momento da regressão luteal ao pico pré-ovulatório (CAHILL *et al.*, 1981), alguns protocolos com modificação na relação de FSH/LH em tempos específicos, tem sido utilizado com sucesso em ovelhas (D`ALESSANDRO *et al.*, 1997). Nesta fase final, o LH poderia agir não só como um substituto de FSH, mas pelo aumento das concentrações de estradiol e elevação da expressão dos receptores de LH, influenciar o número de ovulações. As observações de COGNIÉ *et al.* (1986) sugeriram que a administração de LH ao término da excitação com FSH pudesse aumentar a taxa de ovulação e o número de embriões recuperados. Estes aumentos, como em bovinos, podem diferir entre genótipos (CHUPIN *et al.*, 1985). Neste sentido, PICAZO *et al.* (1996) demonstraram tendência de incremento nas taxas de ovulações e recuperação embrionária em ovelhas Manchega, Churra e Merino, tratadas com protocolos acrescidos de LH ao final da estimulação, observando uma freqüência aumentada de ovelhas que responderam com múltiplas ovulações e decréscimo na taxa de folículos anovulatórios.

A eficiência dos protocolos de superovulação é ainda, afetada pela ocorrência de anormalidades reprodutivas, tão como a presença de folículos anovulatórios (VEIGA-LOPEZ, 2006), que apresenta uma incidência em torno de 20 a 30% (COGNIÉ, 1999). Possivelmente causadas por deficiência ou inexistência da onda pré-ovulatória de LH (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2003), ou pela presença de folículos não responsivos, devido à baixa regulação dos receptores de LH da granulosa e da teca (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar o efeito da administração do hormônio luteinizante (LH) ao final do protocolo de superovulação em ovelhas da raça Santa Inês nas taxas de ovulação e de produção de embriões.

3.2. Específicos

- Avaliar a condição folicular presente ao início do protocolo de superestimulação, quanto à interferência da presença de folículos dominantes na resposta estimulatória, superovulatória e na competência de desenvolvimento dos embriões;

- Verificar o percentual de estro manifestado e o momento do início da receptividade sexual das doadoras após o término dos protocolos de superovulação, correlacionando com o período da ovulação;

- Pesquisar o efeito do acréscimo de LH no final do protocolo na resposta superovulatória das doadoras e sua interferência no período ovulatório;

- Determinar as taxas de ovulação, de folículos anovulatórios, de recuperação e viabilidade de embriões, de estruturas não-fecundadas e degeneradas nos diferentes tratamentos superovulatórios;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* de Jaboticabal, São Paulo, sob o protocolo 21131.

4.1. Local do experimento

O experimento foi desenvolvido entre os meses de maio a novembro de 2007, na Fazenda Betel, localizada no Município de Ibitinga (21º45'28" latitude sul e 48º49'44" longitude oeste), estado de São Paulo, Brasil. O clima é do tipo Aw, classificação de Koeppen (inverno seco e verão úmido), com médias térmicas anuais entre 19,3 ºC e 25,4 ºC, e precipitações pluviométricas anuais médias variando de 20,6 mm e 219,4 mm.

4.2. Animais

Foram selecionadas 10 fêmeas ovinas da raça Santa Inês adultas, pluríparas, não prenhes e não lactantes, pesando em média 60,3 ± 10,74 Kg, com condições de escore corporal médio de 3,95 ± 0,32 (média ± desvio padrão; 1 = magra a 5 = obesa) e consideradas hígidas após realização de exame clínico. Procedeu-se ainda, avaliação ginecológica dos órgãos internos da reprodução por ultra-sonografia trans-retal e os externos por inspeção. Não constavam no histórico, problemas reprodutivos. As fêmeas foram, vacinadas contra Leptospirose[1] e Clostridioses[2], e então, vermifugadas[3] ao início de cada réplica. Todos os animais foram mantidos em pastejo de coast-cross, onde tiveram acesso *ad libitum* à água e sal mineral, além de serem suplementados, uma vez ao dia, com silagem de cana e ração balanceada.

[1] Leptospiro-Vac B™, Irfa, Porto Alegre - RS, Brasil
[2] Covexin10™, Schering-Plough, Cotia- SP, Brasil
[3] Cydectin™, Dosagem: 1mL/50 kg de peso vivo.

4.3. Tratamentos

O experimento foi delineado em "cross-over", sendo cada fêmea submetida por duas vezes ao programa de colheita de embriões, a um intervalo de aproximadamente 60 dias, de modo que todos os animais passaram pelos dois grupos experimentais. Assim, perfazendo um total de 20 programas. Em cada réplica as ovelhas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos e submetidas concomitantemente a tratamentos de superovulação distintos (Tabela 1). O protocolo base utilizado neste experimento segue o padrão tradicional utilizado comercialmente no Brasil, segundo GUSMÃO (2006). O dia inicial dos tratamentos (D0) foi escolhido indiferentemente ao dia do ciclo estral das fêmeas.

Tabela 1 - Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ovelhas submetidas a tratamento de superovulatório e colheita de embriões (FCAV, *campus* de Jaboticabal, UNESP / 2008).

G-C	Protocolo Controle	Réplica 1 (n=5)
		Réplica 2 (n=5)
G-LH	Protocolo LH	Réplica 1 (n=5)
		Réplica 2 (n=5)

n: número de animais por grupo; G-C: Grupo Controle; G-LH: Grupo LH (indutor de ovulação).

Todos os animais (Grupo C - Controle; n=10, Grupo LH, n=10), tiveram o estro sincronizado com a inserção de um implante intravaginal contendo 0,3 g de progesterona[4] no Dia 0, substituindo por um novo no Dia 7, o qual foi mantido até o Dia 14. No momento da troca dos implantes (D7) foi administrado 37,5 µg de d-cloprostenol[5], por via intramuscular. A superestimulação folicular foi realizada pela

[4] Eazi- Breed CIDR™ - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia

[5] Prolise™, Tecnopec, ARCA S. R. L., Argentina

administração intramuscular de 256 mg de FSHp[6] em oito doses decrescentes a intervalos de 12 horas (48, 48, 36, 36, 24, 24, 20 e 20 mg de FSHp), tendo início 48 horas antes da retirada do implante (D12). Ao final do tratamento com progesterona (D14) as fêmeas receberam 200 UI de eCG[7] e 37,5 µg de d-cloprostenol[2], IM. No Grupo Controle (G-C) a taxa FSH/LH foi constante ao longo do tratamento, enquanto no Grupo LH (G-LH) o protocolo preconizou acréscimo de 7,5 mg de LH[8], administrado intramuscularmente 24 horas após a retirada do implante (D15), concomitante a oitava dose de FSHp. Em todas as fêmeas do experimento, foram administradas três doses de 75 mg de Flunixin meglumine[9] a intervalo de 24 horas, iniciando-se um dia após as inseminações, para evitar regressão prematura de corpo lúteo. O esquema dos protocolos está demonstrado na Figura 1.

4.4. Avaliação ultra-sonográfica

Avaliações ultra-sonográficas foram realizadas no 12º dia do protocolo, em um "pool" de oito animais, escolhido aleatoriamente, a fim de pesquisar a condição folicular presente no início do tratamento superestimulatório. Para tal, as observações foram conduzidas com a fêmea em posição quadrupedal, tendo a parede abdominal comprimida, para facilitar a visualização do útero e ovários. Utilizou-se equipamento de ultra-som[10] contendo transdutor linear multifreqüêncial (5, 7 e 9 MHz). Um tubo de plástico ligeiramente curvado (comprimento 30 cm) foi fixado ao cabo do transdutor para permitir sua manipulação externamente. Após deposição do gel[11] sobre o transdutor, este foi introduzido no reto com a superfície de contato posicionada paralelamente a parede abdominal. Quando a bexiga urinária foi

[6] Folltropin™, Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc.,Canadá

[7] Novormon 5000™, Shering-Plough S. A., Syntex S.A., Argentina

[8] Lutropin™, Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc. , Canadá

[9] Banamine™, Shering-Plough S. A., Brasil

[10] Ultra-som, Convex Scaner, HS-2000, Honda, Japão

[11] Gel à base de carboxi-metil-celulose, Gerbras, Latino Química Antex, Argentina

ultrapassada e os cornos uterinos localizados, o transdutor foi lentamente rotacionado para esquerda e direita a fim de observar os ovários e suas estruturas. Todos os folículos ≥ 2 mm detectados pela ultra-sonografia foram quantificados e seus diâmetros mensurados, sendo denominado de F1 e F2 os dois folículos com maiores diâmetros.

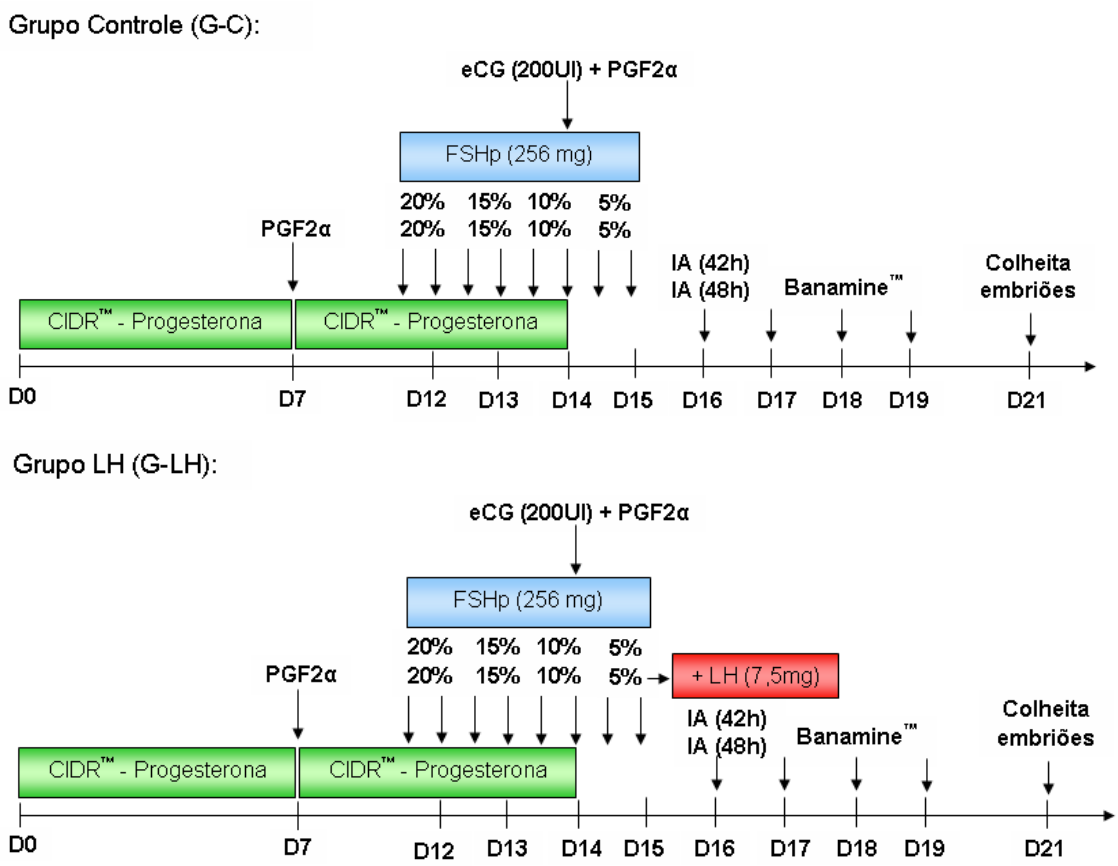


Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação (G-C e G-LH) de ovelhas Santa Inês doadoras de embriões (FCAV, c*ampus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

Legenda:

D0 - Dia zero (início do tratamento com progesterona)
CIDR - Implante intravaginal contendo 0,3 g de progesterona
D7 - Sétimo dia do tratamento com progesterona, dia da troca dos implantes
PGF2α - aplicação de 37,5 µg de d-cloprostenol, análogo da prostaglandina, via intramuscular
D12 - Décimo segundo dia do tratamento com progesterona, início do tratamento superestimulatório
FSHp - Hormônio folículo estimulante de origem porcina, administrado de forma fracionada em oito aplicações com doses decrescentes, a cada doze horas, totalizando 256 mg do hormônio
D13 - Décimo terceiro dia do tratamento com progesterona, segundo dia do tratamento superestimulatório
D14 - Décimo quarto dia (retirada do implante de progesterona e aplicação de 200UI de eCG e 37,5 µg de d-cloprostenol, análogo da PGF2α) e terceiro dia do tratamento superestimulatório
D15 - Décimo quinto dia do protocolo, aplicação das ultimas duas doses de FSHp e administração de 7,5 mg do hormônio luteinizante (LH) nas fêmeas do grupo LH
D16 - Décimo sexto dia (dia das inseminações artificiais)
D17, D18 e D19 - Dias 17, 18 e 19 do protocolo (aplicações de 75mg de Flunixin meglumine)
D21 - Vigésimo primeiro dia (Dia da colheita de embriões)

4.5. Observação de estro

Ao final do tratamento com progesterona, a detecção de estro foi realizada com auxílio de rufiões (machos adultos epididimectomizados) na proporção de 1:4 doadoras, os quais tiveram a região peitoral manchada com graxa colorida. As identificações das fêmeas marcadas foram realizadas três vezes por dia, durante os dois dias seguintes a retirada do implante de progesterona (D15 e D16), detectando assim o momento inicial do estro e a sincronia entre as fêmeas. As fêmeas ficaram constantemente acompanhadas dos rufiões.

4.6. Inseminação artificial

Depois de 24 horas de restrição alimentar e hídrica, foram realizadas duas inseminações intra-uterinas por laparoscopia em tempos pré-fixados, 42 e 48 horas após a retirada do implante de progesterona. Cada fêmea foi colocada em maca cirúrgica apropriada em posição de *Trendelenburg* e recebeu como medicação pré-anestésica, 0,15 mg/Kg, de cloridrato de xilazina a 2%[12] e 0,07 mg/Kg de acepromazina[13], por via intramuscular. No campo cirúrgico, região do abdominal cranial ao úbere, foi feita tricotomia e anti-sepsia com tintura de iodo 2%, e em seguida, anestesia local infiltrativa na dose de 0,04 mg de cloridrato de lidocaína[14] por botão anestésico, onde foram introduzidos os trocartes. Uma vez obtida à visão interna da cavidade, procedeu-se a deposição do sêmen na porção médio-distal de cada corno uterino, utilizando sêmen congelado com qualidade avaliada pelos parâmetros andrológicos físicos e morfológicos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), na quantidade de uma palheta de 0,25 mL de sêmen por corno uterino em cada inseminação, correspondente a 100 x 10^6 espermatozóides/palheta. Os acasalamentos foram escolhidos aleatoriamente, não preconizando a utilização de sêmen de mesmo reprodutor ou partida.

[12] Rompun™, Bayer, Brasil
[13] Acepran™, Univet, Brasil
[14] Lidovet™, Bravet, Brasil

4.7. Avaliação laparoscópica

Durante as laparoscopias para as inseminações artificiais avaliaram-se as estruturas ovarianas, com intuito de pesquisar a resposta estimulatória e estimar o período ovulatório, sendo verificado o número de folículos grandes (4 - 6 mm), de pré-ovulatórios (≥ 6 mm), de recém-ovulados e de corpos lúteos presentes. A partir desses dados, foram estabelecidos três períodos ovulatórios, no qual as fêmeas que no momento da primeira inseminação apresentaram pelo menos um folículo ovulado foram agrupadas no período 1 (P1 - ovulação antes de 42 horas da retirada do implante). As fêmeas que apresentaram folículos ovulados na segunda inseminação foram incluídas ao período 2 (P2 - ovulação entre 42 e 48 horas) e nas que não foram visualizados folículos ovulados em nenhuma das inseminações ao período 3 (P3 - ovulação após 48 horas).

No dia da colheita de embriões, repetiu-se a avaliação das estruturas ovarianas, por via laparoscópica. Os corpos lúteos visualizados foram contados e classificados quanto à qualidade, quando se avaliou tamanho aproximado, coloração e sua protusão na superfície do ovário. Aqueles com diâmetro inferior a aproximadamente 5 mm, de coloração pálida, com pouca ou nenhuma protusão na superfície do ovário foram definidos como anormais, conforme descrito por RUBIANES *et al*. (1996; 1997). Os folículos com diâmetro superior a 5 mm também foram computados sendo nomeados de folículos anovulatórios.

Os dados obtidos foram utilizados para calcular os índices da resposta superovulatória em cada ovelha: taxa de ovulação, calculada pela divisão do número de corpos lúteos observados na colheita de embriões pelo número de folículos pré-ovulatórios no momento da inseminação artificial; número de folículos anovulatórios, calculado pela subtração do número de folículos pré-ovulatórios no momento da inseminação artificial, do número de corpos lúteos observados na colheita de embriões. A taxa de falhas anovulatórias foi obtida pela divisão, em cada ovelha, do número total de folículos anovulatórios pelo número de corpos lúteos mais os folículos anovulatórios.

A resposta superovulatória das ovelhas foi ainda classificada em três escores:

- Escore 0: Fêmeas que não responderam ao tratamento superovulatório, demonstrando 4 ou menos ovulações;
- Escore 1: Fêmeas que responderam ao tratamento superovulatório, com número de corpos lúteos entre 5 e 10;
- Escore 2: Resposta superovulatória alta, apresentando número de corpos lúteos, igual ou superior a 11.

4.8. Colheita de embriões

Os embriões foram colhidos cinco dias após as inseminações artificiais pela lavagem uterina por via cirúrgica. As fêmeas foram previamente mantidas em jejum alimentar e hídrico de 24 horas, recebendo então, como medicação pré-anestésica 0,15 mg/Kg de cloridrato de xilazina a 2% e 0,07 mg/Kg de acepromazina, IM. Em seguida, foi realizada anestesia epidural com 0,02 mg de lidocaína, sendo a fêmea posteriormente colocada em maca cirúrgica apropriada em posição de *Trendelenburg*. No campo cirúrgico destinado aos procedimentos da laparoscopia e laparotomia, região abdominal caudal, foi feito à tricotomia e anti-sepsia com tintura de iodo, seguida pela colocação de panos de campo e realização de anestesia local infiltrativa na dose de 0,04 mg de cloridrato de lidocaína em cada ponto onde foram introduzidos os trocartes. Ato seguinte à avaliação laparoscópica dos ovários e suas estruturas, a maca foi posicionada horizontalmente quando se procedeu à anestesia infiltrativa na dose de 0,2 mg de cloridrato de lidocaína na linha média, e realização de uma incisão de aproximadamente 8 cm. Após identificação, tracionamento cuidadoso e exposição dos cornos uterinos realizou-se a lavagem. Para o procedimento de lavagem de cada corno uterino, introduziu-se sonda “foley” nº 8 na porção proximal, tendo o balão inflado para evitar refluxo de líquido. Na porção distal, próxima à junção útero-tubárica foi colocado um cateter nº 20G por onde o meio

PBS[15] previamente aquecida a 37 ºC foi introduzido, permitindo a formação de um fluxo de líquido pelo corno até sua saída pela sonda "foley". Utilizou-se um volume total de 60 mL de meio PBS por corno lavado. O líquido recuperado foi armazenado em placas de Petri para posterior avaliação das estruturas recuperadas. O corno contra lateral foi posteriormente lavado seguindo o mesmo procedimento. Após as lavagens dos cornos foi colocado no interior da cavidade abdominal, solução Ringer heparinizada, possibilitando minimizar a formação de possíveis aderências. Seguiu-se então, com a sutura das camadas muscular, subcutânea e dérmica.

4.9. Avaliação embrionária

Após as lavagens dos cornos uterinos, o líquido recuperado foi colocado em placas de Petri e avaliado sob aumento de 20 a 50X em estéreo-microscópio. As estruturas encontradas foram transferidas para gotas de meio de manutenção[16] para posterior avaliação. A clivagem foi usada para evidenciar a fecundação dos oócitos. Assim, identificou-se o número de estruturas não fecundadas e os embriões encontrados foram então classificados quanto ao estádio de desenvolvimento. Os embriões em estádio de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto foram ainda classificados quanto à qualidade, sendo considerados viáveis os classificados de graus I a III (Tabela 2). Os embriões em estádio atrasado de desenvolvimento e os classificados em grau IV foram agrupados como estruturas degeneradas.

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

[15] Dulbecco Modificado™ (DPBS), Embriocare, Cultilab, Brasil
[16] Holding plus™, 0,4% BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil

Tabela 2 - Classificação dos embriões quanto à qualidade (FCAV, *campus* de Jaboticabal, UNESP / 2008).

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

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

4.10. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS™ [17]. As variáveis, momento do início do estro; folículos grandes, pré-ovulatórios, recém-ovulados e corpos lúteos durante as inseminações; total de folículos ovulatórios; folículos anovulatórios; corpos lúteos totais e anormais; estruturas recuperadas; embriões viáveis, não fecundados e degenerados; taxas de ovulação, de folículos anovulatórios, de recuperação, de viabilidade, de estruturas não-fecundadas e degeneradas foram expressas em média e desvio padrão da média. Assim, foram analisadas por ANOVA usando o procedimento GLM, sendo comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P<0,05$) e confirmadas pelo teste de Tukey, comparando o efeito dos tratamentos e réplicas. Da mesma forma, a freqüência de ovelhas quanto ao período ovulatório e o escore da resposta ovulatória e a média de corpos lúteos nos diferentes escores foram analisadas.

Os dados do "pool" de animais avaliados quanto à condição folicular no início do tratamento superestimulatório foram separados de acordo com a fase folicular e então comparados às médias e desvio padrão do diâmetro de F1 e F2, número de

[17] SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002

folículos com aproximadamente 2 mm, de folículos ovulatórios, de corpos lúteos e de folículos anovulatórios pelo teste de Kruskal-Wallis. O efeito da condição folicular no número de folículos ovulatórios, corpos lúteos e folículos anovulatórios foi assegurada pela correlação de Spearman. O mesmo procedimento estatístico foi empregado para determinar a correlação entre número de folículos das diferentes categorias de acordo com os grupos experimentais; e entre período de ovulação e início do estro.

A transformação utilizada nas variáveis foi a *raiz quadrada da observação + 1* com o intuito de diminuir o coeficiente de variação, indicativo de alta variabilidade individual.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da condição folicular no início do tratamento superestimulatório

Em todos os animais propostos foi possível, pela ultra-sonografia trans-retal, visualizar os ovários e realizar a identificação dos folículos e suas mensurações, conforme procedimentos descritos na literatura (SCHRICK *et al*., 1993; EVANS *et al*., 2000; VIÑOLES *et al*., 2004). Não foi observada presença de corpos lúteos em nenhum dos animais avaliados no dia do início do tratamento com FSH, sendo este fato, possivelmente atribuído à administração de d-cloprostenol, análogo da prostaglandina F2α, no D7 do protocolo.

Notou-se em 62,5% destes animais, presença de folículos com diâmetro ≥4mm (4,58 ± 0,11mm, média ± desvio padrão) ao início do tratamento gonadotrófico, e no restante (37,5%), apenas presença de folículos com diâmetro de aproximadamente 2mm (2,36 ± 0,15mm; $P<0,05$). Logo, pode-se considerar que as fêmeas estavam respectivamente, em fase de dominância e recrutamento, segundo EVANS *et al*. (2000). Esses resultados demonstraram que o protocolo de sincronização utilizado como base, no presente experimento, não promoveu a sincronização da emergência da onda, podendo-se observar, ao início do protocolo

superestimulatório, diferentes momentos de onda entre as ovelhas. Estes achados, portanto, divergem do enfoque dado em diversos estudos publicados nos últimos anos, que enfatizam a importância de iniciar o tratamento gonadotrófico no dia da emergência da onda folicular, “Protocolo Dia 0” (RUBIANES *et al*., 1997; MENCHACA *et al*., 2002; GONZALEZ-BULNES *et al*., 2002; GONZALEZ-BULNES *et al*., 2003). Esses autores associam a presença ou ausência de folículo dominante no início desses tratamentos à alta variabilidade na resposta superovulatória.

O número médio de folículos de aproximadamente 2mm, presentes nos ovários destas fêmeas, no início do tratamento superestimulatório com FSH e o número de folículos ovulatórios presente no momento das inseminações foram de 15,87±2,10 e 14,75±3,24, respectivamente, observando-se alta correlação entre esses valores (R= 0,95; Coeficiente de correlação de Spearman, P=0,0003). Nota-se que estes valores corroboram VEIGA-LOPEZ *et al*. (2006), os quais demonstraram tendência positiva na relação entre essas médias. Da mesma forma, grande correlação foi verificada, no presente experimento, entre o número de folículos ≥ 2 mm no início do tratamento superestimulatório e o número total de corpos lúteos mais folículos anovulatórios; a qual, também está em acordo com os dados apresentados por VEIGA-LOPEZ *et al.* (2006). Assim, esses resultados podem contribuir para comprovar a eficiência do exame ultra-sonográfico e laparoscópico realizado neste experimento.

Os dados desses animais foram ainda agrupados em categorias, de acordo com o momento na onda folicular, e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias e desvio-padrão do diâmetro dos folículos maiores (F1 e F2), do número de folículos com diâmetro de aproximadamente 2 mm presentes no início do tratamento superestimulatório, do número médio de folículos ovulatórios no momento da inseminação artificial e do número de corpos lúteos e de folículos anovulatórios de acordo com as categorias da fase folicular (FCAV, *campus* de Jaboticabal, UNESP / 2008).

Categorias	N	Diâmetro dos folículos F1	Diâmetro dos folículos F2	Nº Folículo ~ 2 mm	Nº Folículo Ovulatório	Nº Corpo Lúteo	Nº Folículo Anovulatório
Fase recrutamento (≥ 2 mm)	3	2,43 ± 0,17[a]	2,23 ± 0,15[a]	15 ± 3,60[a]	13,33 ± 5,13[a]	9,66 ± 6,42[a]	3,66 ± 2,88[a]
Fase dominância (≥ 4 mm)	5	4,46 ± 0,19[b]	3,48 ± 0,37[b]	16,4 ± 0,54[a]	15,6 ± 1,67[a]	12,4 ± 4,03[a]	3,2 ± 2,48[a]

N: número de animais por categoria

[a,b] Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

De acordo com as médias e desvio-padrão apresentadas nesta Tabela, observa-se diferença estatística nos diâmetros dos folículos F1 e F2 entre as categorias, não havendo, entretanto, diferença significativa no número de folículos de aproximadamente 2 mm. Esses resultados demonstram que nesses animais, não houve inibição do recrutamento folicular pela presença de folículos grandes, aparentemente dominantes, embora o efeito supressivo desses folículos seja há vários anos relatado em bovinos (HUHTINEN *et al*., 1992; HUNTER, 1991; PIERSON & GINTHER, 1988) e mais recentemente em ovinos e caprinos (MENCHACA *et al*., 2002; RUBIANES *et al.,* 1997).

Os números de folículos ovulatórios e de corpos lúteos desses animais também não apresentaram diferença estatística entre as categorias (P>0,05). Esse resultado propõe que a diferença da condição folicular no início do tratamento gonadotrófico não influenciou a resposta superestimulatória e superovulatória. Segundo RUBIANES *et al.* (1997), a resposta estimulatória inicial é maior em fêmeas que iniciam o tratamento com FSH no dia da ovulação (D0), entretanto decorridas 72 horas o número de folículos grandes é similar entre as fêmeas com início da estimulação nos dias 0 e 3, demonstrando que o FSH exógeno tem efeito de anular a

supressão do folículo dominante sobre os demais. Porém, baixa habilidade de ovulação foi comprovada por RUBIANES *et al*. (1997; 1995). Para VEIGA-LOPEZ *et al.* (2006), pode ser observada maturação inadequada dos folículos menores por interferência da presença dos maiores.

Para o número de folículos anovulatórios, da mesma forma, não se observou diferença estatística entre as categorias, contrastando com os achados de VEIGA-LOPEZ *et al*. (2006), quando mostraram a possibilidade da divergência entre dominantes e recrutados no início do tratamento com FSH estar relacionada à alta freqüência de folículos anovulatórios.

5.2. Avaliação da manifestação de estro

Os protocolos utilizados neste experimento preconizaram a inseminação em tempo pré-fixado, portanto, sem a necessidade de observação de estro. Contudo, essa avaliação foi realizada com intuito de permitir melhor acompanhamento das respostas aos tratamentos.

Todas as ovelhas do experimento manifestaram sinais de estro nos dois dias após a remoção dos implantes de progesterona. Não foi observada variação estatística entre os grupos no intervalo entre a retirada dos implantes e início do estro, quando as médias ± desvio-padrão encontradas foram de 25,2 ± 6,19h para o grupo controle (G-C) e de 28,8 ± 12,59h para o grupo LH (G-LH). Dessa forma, observa-se início de estro anterior aos relatados por SIMONETTI *et al.* (2008) e CORDEIRO *et al.* (2003), quando da utilização de protocolos com administração de múltiplas doses de FSH. Uma possível explicação pode estar relacionada ao emprego da associação de eCG e FSH. Essa hipótese é sustentada por SIMONETTI *et al.* (2008), quando verificaram atraso no pico pré-ovulatório de LH e na manifestação de estro quando o eCG não foi incluído ao tratamento. Por outro lado, o intervalo entre a retirada dos implantes e início do estro pode ter sido menor, em virtude das fêmeas terem sido mantidas continuamente com os machos rufiões no período de observação de estro. Segundo ROMANO *et al.* (2001) e ROMANO

(1998), os fatores relacionados a este fato ainda são desconhecidos, mas é evidente, que a presença contínua do macho resulta numa redução significativa no início do estro. Os autores ainda referem que quando continuamente presente, o macho tem a oportunidade de expressar o seu completo comportamento sexual: corte e monta.

Observou-se grande variação individual na distribuição do momento inicial do estro (Figura 2). As ovelhas do G-C apresentaram estros concentrados entre 18 e 36 horas após remoção do implante, enquanto as fêmeas do G-LH mostraram ocorrência de estro mais distribuída ao longo do período de observações (12-48 horas). Verificou-se ainda, maior incidência de início de estro, as 24 e 36 horas para o G-C e G-LH, respectivamente, o que correspondeu a 60% das fêmeas por grupo. Essa diferença entre os grupos possivelmente não foi atribuída à administração de LH ao final do protocolo e, a grande variação individual reafirma a ausência de sincronismo promovido, entre os animais tratados, pelos protocolos experimentais.

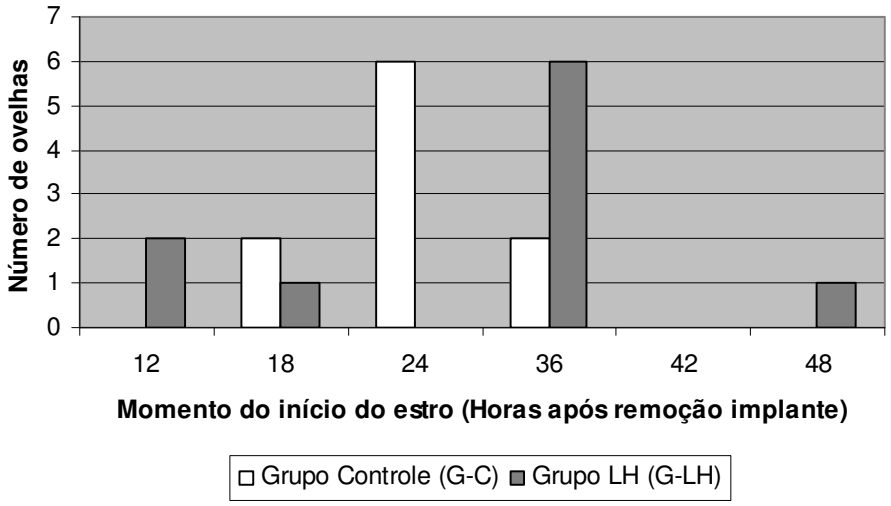


Figura 2. Histograma da distribuição das ovelhas em estro conforme o intervalo entre a retirada do implante de progesterona e início do estro (horas). (FCAV, c*ampus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

5.3. Resposta superestimulatória e período ovulatório

No momento das inseminações artificiais todas as estruturas presentes na superfície dos ovários, foram visualizadas e catalogadas, de acordo com as categorias, e então quantificadas, tendo seus valores apresentados na Tabela 4. Observou-se um total de 135 (13,5 ± 3,43) e 158 (15,8 ± 5,18) folículos de tamanho ovulatório, para os grupos controle e LH, respectivamente, não evidenciando diferença estatística entre os grupos (P>0,05). O resultado dessa análise foi esperado visto que, a diferença entre os protocolos se restringiu ao acréscimo do indutor de ovulação.

Durante a primeira avaliação laparoscópica (concomitante à 1ª inseminação artificial, 42h) verificou-se que 62,96% dos folículos quantificados no grupo controle foram catalogados como folículos grandes (diâmetro de 4-6mm), enquanto no grupo LH, 40,50% e 31,64% eram folículos pré-ovulatórios (diâmetro ≥ 6 mm) e recém-ovulados, respectivamente (Figura 3). Os resultados mostram no G-LH, presença de folículos em estágio de desenvolvimento mais avançado que no G-C, no momento da primeira inseminação. Verificou-se ainda, diferença estatística no número médio de folículos grandes e pré-ovulatórios entre os grupos (P<0,05). Baseado nesses dados pode-se sugerir que a administração de LH ao final do tratamento antecipou o crescimento e maturação final dos folículos.

Na segunda avaliação laparoscópica verificou-se que, no G-C, a maioria dos folículos (54,07%) ainda era classificada como grandes, sendo diferente do G-LH, que apresentava apenas 25,94% de folículos nesta categoria (P<0,05). Notou-se ainda, pela freqüência de distribuição nas categorias foliculares, no momento da segunda inseminação artificial, uma grande desproporção que, possivelmente provocou uma variação no momento ovulatório dos folículos de cada fêmea, visto que ao final, 77,77% e 85,44% dos folículos ovularam para o grupo controle e LH, respectivamente. Uma possível explicação para essa variação no período ovulatório dos folículos de uma mesma fêmea pode ser atribuída à variação dos diâmetros foliculares ao final dos protocolos.

Tabela 4 - Distribuição da freqüência, média ± desvio-padrão de folículos grandes (FG), pré-ovulatórios (FPO), ovulados e corpos lúteos avaliados no momento da primeira e segunda inseminação artificial (IA) e folículos anovulatórios e corpos lúteos avaliados durante colheita de embriões (C.E.) nos diferentes grupos (FCAV, c*ampus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

		G-C			**G-LH**		**Total**	
Aval.	**Variáveis**	**%**	**Média ± DP**	**R**	**%**	**Média ± DP**	**%**	**Média ± DP**
	Total Folículos	135	13,5 ± 3,43[a]	0,45	158	15,8 ± 5,18[a]	293	14,65 ± 4,43
1ª IA	FG (4 - 6 mm)	62,96% (85/135)	4,25 ± 3,02[a]	0,17	25,94% (41/158)	2,05 ± 2,83[b]	43,00% (126/293)	3,15 ± 3,10
	FPO (≥ 6 mm)	17,77% (24/135)	1,2 ± 2,28[a]	0,06	40,50% (64/158)	3,2 ± 2,82[b]	30,03% (88/293)	2,20 ± 2,72
	Recém - Ovulado	17,77% (24/135)	1,2 ± 2,33[a]	0,39	31,64% (50/158)	2,5 ± 3,23[a]	25,25% (74/293)	1,85 ± 2,86
	Corpo Lúteo	1,48% (2/135)	0,1 ± 0,44[a]	0,68	1,89% (3/158)	0,15 ± 0,36[a]	1,70% (5/293)	0,12 ± 0,40
2ª IA	FG (4 - 6 mm)	54,07% (73/135)	3,65 ± 2,68[a]	0,35	25,94% (41/158)	2,05 ± 2,83[b]	38,90% (114/293)	2,85 ± 2,84
	FPO (≥ 6 mm)	12,59% (17/135)	0,85 ± 1,03[a]	0,51	30,37% (48/158)	2,4 ± 2,47[a]	22,18% (65/293)	1,62 ± 2,03
	Recém - Ovulado	14,07% (19/135)	0,95 ± 1,57[a]	0,55	24,68% (39/158)	1,95 ± 2,21[a]	19,79% (58/293)	1,45 ± 1,96
	Corpo Lúteo	19,25% (26/135)	1,3 ± 2,36	0,07	18,98% (30/158)	1,5 ± 3,05[a]	19,11% (56/293)	1,40 ± 2,69
C.E.	Fol. Anovulat. (≥6 mm)	22,22% (30/135)	3,00 ± 3,19[a]	0,74	14,55% (23/158)	2,3 ± 1,63[a]	18,08% (53/293)	2,65 ± 2,49
	Corpo Lúteo	77,77% (105/135)	10,5 ± 3,80[a]	0,54	85,44% (135/158)	13,5 ± 4,83[a]	81,91% (240/293)	12,00 ± 4,50

[a,b] Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

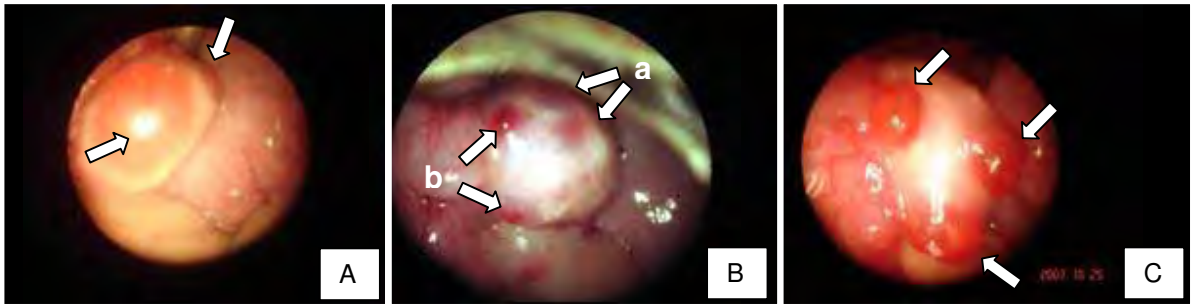


Figura 3 - Imagens obtidas por laparoscopia. **A** - Ovário contendo folículos pré-ovulatórios; **B** - Ovário contendo folículos grandes (a) e ovulados (b); **C** - Ovário contendo corpos lúteos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

Quanto ao período das ovulações houve grande variação dentro dos grupos, observando que o maior número de ovelhas do grupo controle (4/10, 40%) ovularam após a segunda inseminação (P3: após 48h da retirada do implante), enquanto nas ovelhas do grupo LH, a maioria das ovulações ocorreu, antes de 42h da retirada do implante, no período 1 (6/10, 60%; tabela 5). Entretanto, não se evidenciou diferença estatística entre os grupos com relação ao período de ovulação (P>0,05). Possivelmente, essa ausência de diferença estatística deva-se também à grande variação observada no momento ovulatório entre as fêmeas de um mesmo grupo. Mesmo assim, pode-se observar tendência de antecipação do período ovulatório nas fêmeas do grupo LH onde, levanta-se a hipótese que quando a indução da ovulação for associada a protocolos que efetivamente sincronizam a onda folicular, essa diferença se fará significativa.

Observou-se ainda no presente experimento, baixa correlação entre o período ovulatório e o momento inicial do estro (R=0,25; Coeficiente de correlação de Spearman, P>0,001). Esse fato demonstra que a observação de estro apresenta baixa eficácia, principalmente, em protocolos de indução da ovulação, onde se emprega a inseminação artificial em tempo fixo. Assim, enfatiza-se a importância fundamental da realização do acompanhamento da dinâmica folicular para determinação do momento ou período ovulatório, conforme realizada neste experimento pelas avaliações laparoscópicas dos ovários.

Os resultados obtidos a partir dessas avaliações não puderam ser comparados aos da literatura devido à escassez de informações publicadas a respeito da observação do momento das ovulações em ovelhas superestimuladas.

Tabela 5 - Percentual de ovelhas que ovularam nos diferentes períodos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

	Períodos de ovulação		
Grupos	**P1 (< 42 h)**	**P2 (42 - 48 h)**	**P3 (> 48 h)**
G-C	30% [a] (3/10)	30% [a] (3/10)	40% [a] (4/10)
G-LH	60% [a] (6/10)	10 % [a] (1/10)	30% [a] (3/10)
Total	45% (9/20)	20 % (4/20)	35% (7/20)

P1: Período 1; P2: Período 2 e P3: Período 3.

[a] Análise realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

5.4. Resposta superovulatória e produção de embriões

A resposta superovulatória das ovelhas, criteriosamente avaliada pela contagem dos corpos lúteos no dia da colheita de embriões e classificada em três escores, foi de 100% nos dois grupos experimentais, apresentando número de corpos lúteos superior ou igual a 5. Dessa forma, verifica-se que os protocolos utilizados neste experimento são capazes de promover resposta satisfatória, conforme demonstrado comercialmente há vários anos no Brasil (GUSMÃO, 2006).

A administração do hormônio luteinizante ao final do tratamento gonadotrófico resultou em incremento não significativo na freqüência de ovelhas com resposta alta (Tabela 6). Entretanto, aumento da freqüência de múltiplas ovulações em ovelhas Manchega, Churra e Merina foi relatada por PICAZO *et al*. (1996). Dessa forma, confirma o relato de que estes aumentos, assim como em bovinos (CHUPIN *et al*., 1985), podem diferir entre genótipos.

Tabela 6 - Distribuição da freqüência de ovelhas de acordo com a resposta ovulatória e a média ± desvio-padrão do número de corpos lúteos (CL) em cada categoria (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

	Resposta superovulatória									
	Escore 0		**Escore 1**				**Escore 2**			
Grupos	%	Média CL	%	Média CL	Mínimo	Máximo	%	Média CL	Mínimo	Máximo
G-C	0,0	-	50,0[a]	7,66 ± 2,06[a]	5	10	50,0[a]	14,25 ± 0,95[a]	13	15
G-LH	0,0	-	30,0[a]	7,33 ± 0,70[a]	7	8	70,0[a]	16,14 ± 2,79[a]	12	20
Total	0,0	-	40,0	7,11 ± 2,02	5	10	60,0	15,45 ± 2,42	12	20

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

[a] Análise entre linhas realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Das oito fêmeas que apresentaram resposta classificada em Escore 1, apenas duas participavam pela primeira vez ao programa de colheita de embriões, sugerindo uma diminuição no número de corpos lúteos quando as fêmeas foram submetidas pela segunda vez ao tratamento (Figura 4). Neste contexto, foi realizada comparação estatística para avaliar o efeito entre as réplicas nos dois grupos, não observando diferença no G-C, enquanto para o G-LH, houve decréscimo significativo no número de corpos lúteos quando esse tratamento foi utilizado na segunda réplica (P<0,05). Esses relatos demonstram que o emprego do protocolo acrescido de LH promoveu resposta maior quando realizado na primeira réplica, sendo ineficaz em aumentar essa resposta quando utilizado em fêmeas que haviam participado recentemente do programa de múltipla ovulação.

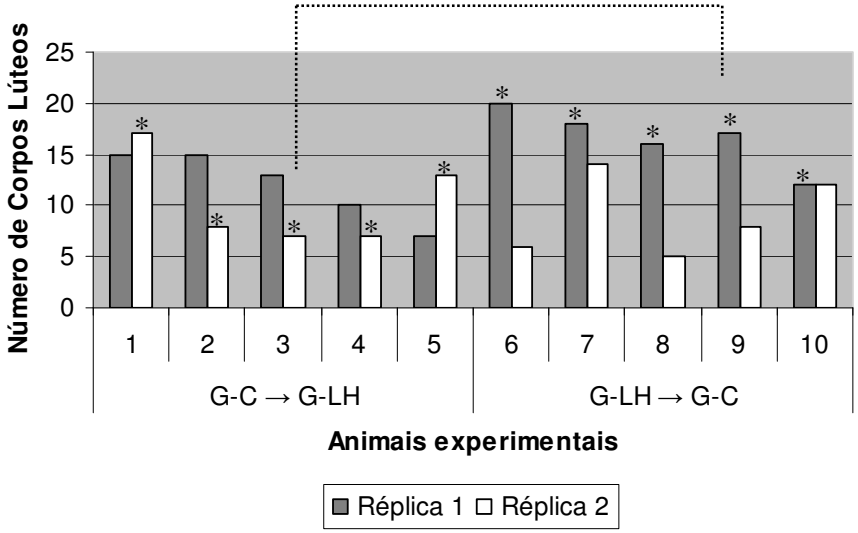


Figura 4 - Histograma do número de corpos lúteos presentes no dia da colheita de embriões em função dos animais experimentais nas duas réplicas (* P<0,05; FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

A resposta ovariana ao tratamento superovulatório indicou um valor médio de 10,5 ± 3,80 *versus* 13,5 ± 4,84 corpos lúteos para os grupos controle e LH, respectivamente, não sendo observada diferença estatística (P>0,05). O acréscimo de LH ao final do protocolo de superovulação promoveu em 60% das ovelhas, número maior de corpos lúteos quando receberam o tratamento controle. Todas as ovelhas que o protocolo adicionado de LH não foi capaz de aumentar o número de corpos lúteos em relação ao tratamento controle (30%) receberam esse tratamento na segunda réplica (Figura 5), como anteriormente exposto.

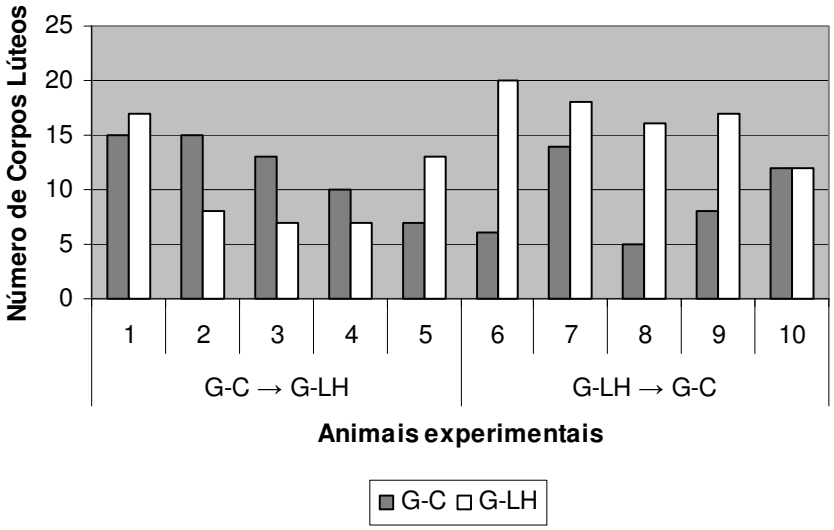


Figura 5 - Histograma do número de corpos lúteos em função dos animais experimentais nos diferentes grupos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

Sabe-se que ovelhas normalmente exibem uma inadequada formação luteal, causada pela regressão prematura de corpos lúteos (FORCADA *et al.,* 2006). Para tal, estudos anteriores demonstram a necessidade da adição de inibidores da prostaglandina-sintetase aos protocolos superovulatórios (SCHIEWE *et* al., 1991; TRALDI, 2002), o qual foi preconizado nos protocolos propostos neste experimento. Entretanto, a formação de corpos lúteos considerados anormais foi observada em 20% das ovelhas que responderam ao tratamento controle, enquanto que no grupo acrescido com LH, 40% demonstraram falhas na formação lútea. Entre esses animais o número médio de corpos lúteos anormais foi de 3,00 ± 1,41 e 1,25 ± 0,5, para o G-C e G-LH, respectivamente. Dessa forma, observou-se que o comprometimento na formação lútea foi pontual, já que um mesmo individuo apresentou corpos lúteos normais e anormais. Esse achado, contudo, diverge de RUBIANES *et al*. (1995), quando afirmam ser um mecanismo geral ou sistêmico.

Nota-se ainda, que essas alterações foram detectadas apenas em resposta à segunda réplica, demonstrando a possibilidade da exposição repetida a esses

tratamentos interferir no desenvolvimento dos corpos lúteos, ou ainda sugere-se que a ação preventiva do Flunixin Meglumine possa ter sido sobreposta pelo efeito da réplica. No entanto, diferença estatística entre as réplicas para corpos lúteos anormais, foi apenas verificada no grupo de fêmeas tratado na segunda réplica com o protocolo acrescido de LH ($P<0,05$), sugerindo que esse hormônio possa ter promovido a ovulação de folículos sem capacidade adequada de formação luteal. Neste sentido, SCHRAMM *et al.* (1983) reportam que a administração de GnRH no momento em que os folículos se encontram com maturação incompleta, induz a formação de corpos lúteos com células luteais insuficientes e com função inadequada, relatando que o fenômeno de formação de corpos lúteos anormais seja devido à hipoplasia luteal de corpos lúteos incompletos e com período de vida curto. Diferentemente, OKADA *et al.* (2000) afirmam que a regressão luteal prematura de corpos lúteos considerados normais é devido a PGF2α ou outros fatores. O presente experimento foi baseado nesta segunda afirmação, preconizando, portanto, o incremento do protocolo com aplicações de Flunixin Meglumine.

Um total de 53 folículos anovulatórios foi detectado, o qual representa 18,08% das estruturas que desenvolveram-se até o tamanho ovulatório em resposta ao tratamento com FSH, corroborando a incidência de folículos anovulatórios apresentada por COGNIÉ (1999). Levando como base, a descrição de GONZALES-BULNES *et* al. (2003), de que a ocorrência de folículos anovulatórios possa ser causada pela deficiência ou inexistência da onda pré-ovulatória de LH, o presente experimento preconizou o acréscimo de LH ao protocolo de superovulação, idealizando a hipótese de que essa alteração pudesse diminuir o número e a taxa de folículos anovulatórios. Contudo, a média do número de folículos anovulatórios do presente experimento, não diferiu estatisticamente entre os grupos controle e LH (3,0 ± 3,19 *versus* 2,3 ± 1,63, respectivamente; Tabela 7). Assim, pode-se atribuir esse fato à hipótese de que estas falhas ovulatórias tenham sido causadas pela presença de folículos não responsivos (LOPEZ-DIAZ & BOSU, 1992). Uma segunda justificativa pode ser atribuída à administração de altas doses de FSH exógeno nos protocolos superovulatórios, onde estas alteram o eixo endócrino, promovendo baixa

secreção de LH endógeno (KENDALL *et al*., 2004) ou pico pré-ovulatório em momento impróprio (D'OCCHIO *et al*., 1999; NÖEL *et al*., 1994). Sabe-se ainda que, mesmo que o pico pré-ovulatório de LH ocorra em momento adequado, este é ineficiente devido a prévia desensibilização dos receptores de LH nos folículos (GARCIA-GARCIA, 2003).

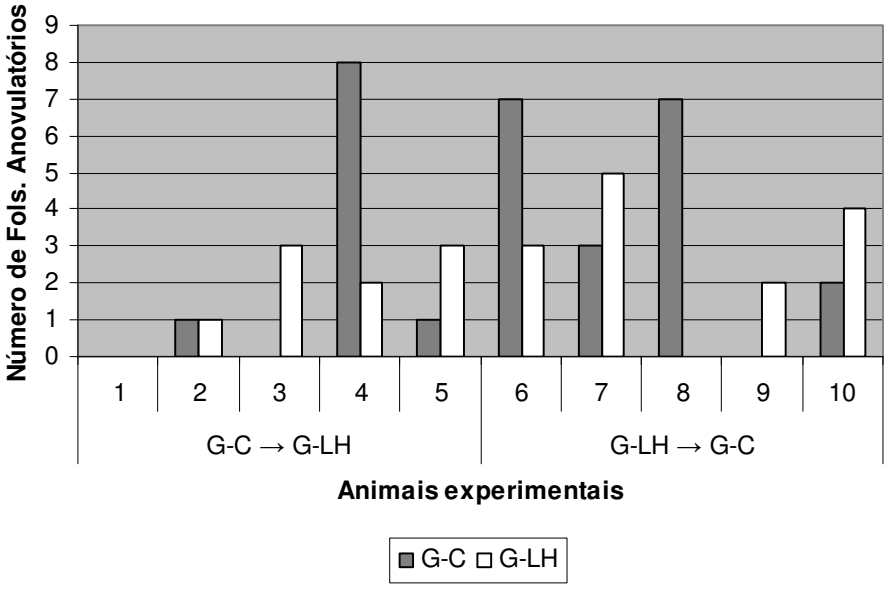


Figura 6 - Histograma do número de folículos anovulatórios em função dos animais experimentais nos diferentes grupos (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

Vale ressaltar ainda, de acordo com os dados apresentados na Figura 6, a ocorrência de grande variação da resposta individual quando, observou-se que uma das fêmeas que não apresentou folículos anovulatórios em resposta a qualquer um dos protocolos, e fêmeas que exibiram número de folículos anovulatórios maior tanto no tratamento controle (30%) quanto no acrescido de LH (40%).

Os índices da resposta superovulatória e da produção de embriões estão sumarizados na Tabela 7. A administração de LH ao final do tratamento com FSH não resultou em incremento na taxa de ovulação, embora tenha sido observado um

ligeiro aumento percentual (78,69 ± 22,72 *versus* 84,75 ± 10,13 para G-C e G-LH, respectivamente; P>0,05). Resultados semelhantes foram observados por PICAZO *et al*. (1996). A ausência de diferença estatística observada no presente experimento pode ser atribuída à ampla variabilidade nas respostas frente ao desafio gonadotrófico que é, certamente, o principal fator limitante da transferência de embriões em ovinos (COGNIÉ, 1999; DRIANCOURT, 2001). A taxa de ovulação também não sofreu efeito de réplica, corroborando os achados de CORDEIRO *et al.* (2003).

Para a produção de embriões, é importante relatar a ocorrência de uma fêmea que apresentava uma ligação entre os ovários, o que levou a não recuperação de estruturas em nenhuma das réplicas, possivelmente por falha na captura dos oócitos (Figura 7). Para evitar a diminuição indevida dos números e taxas relacionadas à produção de embriões do presente trabalho, esta fêmea foi desconsiderada para o cálculo das médias e desvio-padrão.

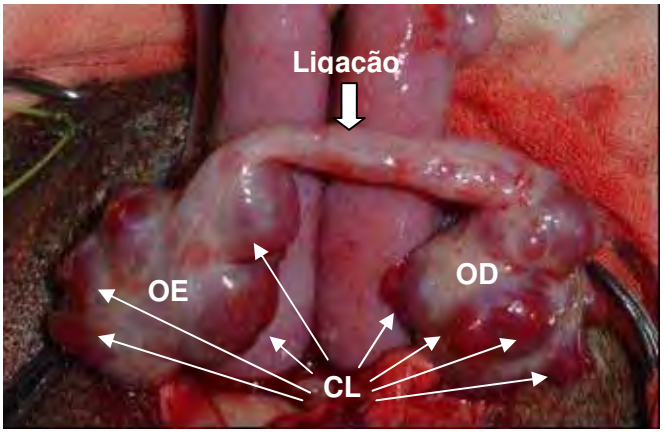


Figura 7. Fotografia ilustrando a ligação entre os ovários, esquerdo (OE) e direito (OD) de uma ovelha e os corpos lúteos (CL) no dia da colheita de embriões (FCAV, *campus* de Jaboticabal - UNESP / 2008).

Tabela 7 - Índices da resposta superovulatória e da produção de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação suplementado ou não com LH (FCAV - *campus* Jaboticabal - UNESP, 2008).

Variáveis	Grupo Controle (G-C) Média	Valores Mínimo	Valores Máximo	Grupo LH (G-LH) Média	Valores Mínimo	Valores Máximo	Total
Número de programas	10			10			20
Ovelhas superovuladas	100%[a]			100%[a]			100%
Nº corpos lúteos	10,5 ± 3,8[a]	5	15	13,5 ± 4,84[a]	7	20	12,00 ± 4,50
Taxa de ovulação (%)	78,69 ± 22,72[a]	41,66	100	84,75 ± 10,13[a]	70	100	81,72 ± 17,40
Folículos Anovulatórios	3,00 ± 3,19[a]	0	8	2,30 ± 1,63[a]	0	5	2,65 ± 2,49
Taxa de Fol. Anovulatórios	3,40 ± 3,68[a]	0	8,80	2,49 ± 1,74[a]	0	5,28	2,94 ± 2,84
Nº Estruturas recuperadas	6,11 ± 4,59[a]	1	14	8,44 ± 5,22[a]	2	15	7,27 ± 4,92
Taxa de recuperação (%)	51,67 ± 30,24[a]	7,14	93,33	59,23 ± 21,81[a]	28,57	88,23	55,45 ± 25,87
Nº Embriões viáveis	3,77 ± 4,29[a]	0	13	4,22 ± 5,19[a]	0	15	4,00 ± 4,62
Taxa de viabilidade (%)	64,23 ± 43,45[a]	0	100	38,99 ± 32,86[a]	0	73,33	51,61 ± 39,56
Nº Estrut. Não fecundadas	1,66 ± 3,39[a]	0	9	2,00 ± 2,91[a]	0	9	1,83 ± 3,07
Taxa Não Fecundação (%)	18,33 ± 36,57[a]	0	90	31,90 ± 41,46[a]	0	100	25,12 ± 38,57
Nº Embriões degenerados	0,66 ± 0,70[a]	0	2	2,22 ± 1,78[a]	0	5	1,44 ± 1,54
Taxa de degeneração (%)	17,42 ± 32,32[a]	0	100	29,09 ± 28,38[a]	0	83,33	23,26 ± 30,11

[a] Análise realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

O número médio e a taxa de estruturas recuperadas não diferiram estatisticamente entre os grupos (P>0,05), observando valores de 6,11 ± 4,59 e 51,67 ± 30,24 para o grupo controle e 8,44 ± 5,22 e 59,23 ± 21,81 para o grupo LH, respectivamente. A ausência de diferença estatística foi esperada, visto que realizou-

se o mesmo procedimento cirúrgico de colheita de embriões em todos os animais deste experimento.

Avaliando o efeito de réplica para número de estruturas recuperadas, diferença foi observada nos grupos LH (13,5 ± 2,38 *versus* 4,4 ± 2,07, 1ª e 2ª réplica; P<0,05) e controle (8,2 ± 3,96 *versus* 3,5 ± 4,35, 1ª e 2ª réplica; P<0,05). Para taxa de recuperação a queda foi apenas numérica (65,8 ± 19,2 e 34,1 ± 34,1, para 1ª e 2ª réplica; G-C e 81,1 ± 0,5 e 41,8 ± 0,81, para 1ª e 2ª réplica, G-LH). A diferença de valores entre as réplicas pode ser atribuída a efeitos ambientais como a luminosidade, visto que a segunda réplica foi realizada nos meses de setembro, outubro e novembro, período considerado como estação de anestro para ovelhas, devido o aumento da duração dos dias. Os fatores que interferem na eficiência do processo como um todo, podem ser inerentes a variáveis, como raça, estações do ano, manejo. O manejo do rebanho, incluindo a nutrição, aliado às condições geográficas faz com que uma mesma raça responda diferentemente em locais diferentes do mundo, ou mesmo em estações diferentes (GORDON, 1997). No presente experimento, pode-se constatar que o manejo nutricional não apresentou alterações significantes durante sua execução, entretanto, houve alterações climáticas, principalmente referentes a aumento da luminosidade ao período final do experimento. É pertinente considerar que estes fatores, separados ou agregados, agindo de forma direta ou indireta, podem ter colaborado para estes resultados.

Quanto ao número de embriões viáveis e taxa de viabilidade, não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais (P>0,05). Quando se analisou efeito de réplica, diferença foi observada apenas para no grupo controle (6,2 ± 4,43 *versus* 0,75 ± 0,95 para 1ª e 2ª réplica, respectivamente; P<0,05), enquanto no grupo LH a diferença foi apenas numérica (8,25 ± 5,56 *versus* 1,00 ± 1,22 para 1ª e 2ª réplica, respectivamente). Os valores menores observados na segunda réplica podem ser justificados, da mesma forma que para o número de estruturas recuperadas, efeito do período em que foram realizadas.

O declínio numérico para o G-LH na taxa de viabilidade mencionada anteriormente foi acompanhado pelo aumento no número de estruturas não fecundadas (1,50 ± 3,24 *versus* 1,80 ± 2,82, para G-C e G-LH, respectivamente; P>0,05) e embriões degenerados (0,60 ± 0,69 *versus* 2,00 ± 1,82, para G-C e G-LH, respectivamente). Não houve diferença estatística para essas variáveis para o efeito de réplica (P>0,05). Dessa forma, a taxa de estruturas não fecundadas foi de 16,50 ± 34,96 para o grupo controle e 28,71 ± 40,37 para o grupo LH e a taxa de degeneração foi de 15,68 ± 30,96 *versus* 26,18 ± 28,30, para o G-C e G-LH, respectivamente. Essas observações podem estar associadas a momentos inadequados das inseminações artificiais, quando considera-se que no grupo LH, 60% das fêmeas já apresentavam folículos recém-ovulados à primeira inseminação. Entretanto, vale ressaltar que a determinação dos horários das inseminações artificiais realizadas neste experimento, levou como base as recomendações de GUSMÃO (2006), quando sugere que a primeira ou a única inseminação deva ser feita 36 horas após a retirada do dispositivo. Como essas recomendações são preconizadas para sêmen fresco e em nosso protocolo experimental utilizou-se sêmen congelado, determinamos o atraso dos momentos das inseminações para 42 e 48 horas. É sabido que a meia-vida dos espermatozóides submetidos ao processo de congelação é menor, devido já terem iniciado sua capacitação (MIES FILHO, 1978).

6. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos achados desta investigação permitiu concluir que:

1. A administração do hormônio luteinizante ao final do tratamento (G-LH) resultou em incremento na freqüência de ovelhas com resposta superovulatória superior a 11 corpos lúteos, associado a um aumento numérico na taxa de ovulação.
2. Quanto ao período ovulatório, averiguou-se no grupo LH (G-LH) maior percentual de ovelhas que ovularam antes de 42 horas e no grupo controle (G-C), após as 48 horas, no entanto, sem diferença estatística.
3. O percentual de estro manifestado e o momento do início da receptividade sexual não sofreram influência da administração de LH ao final do protocolo, não sendo correlacionado ao período das ovulações.
4. Não houve relação entre a taxa de folículos anovulatórios e a adição de LH ao protocolo de superovulação.
5. As taxas de recuperação e viabilidade de embriões sofreram diminuição com a repetição do programa de colheita neste experimento. A variável “grupo” não causou influência sobre estas taxas, bem como sobre os valores de não fecundados e de degenerados.
6. A menor taxa de viabilidade no grupo LH foi acompanhada pelo aumento das taxas de degeneração e estruturas não fecundadas, possivelmente influenciadas pelos momentos inadequados das inseminações artificiais.
7. A condição folicular presente ao início do protocolo gonadotrófico nos animais avaliados, não apresentou correlação com a resposta superestimulatória e de múltipla ovulação.

7. REFERÊNCIAS[18]

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.19, p.31-42, 1983.

BAIRD, D. T. Luteotrophic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.95-102, 1992.

BARIL, G.; BREDION, P.; CHESNÉ, P. **Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras**. Roma: FAO, 175 p., 1995.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.35, p.5–17, 1991.

BUNGARTZ, L.; NIEMMAN, H. Assesssment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 583-591, 1994.

CAHILL, L. P.; SAUMANDE, J.; RAVAULT, J. P.; BLANC, M.; THIMONIER, J.; MARIANA, J. C. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. **Journal Reproduction and Fertility**, v.62, p.141–150, 1981.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª edição, Belo Horizonte: CBRA, 49 p., 1998.

CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Different effect of LH-induced superovulation in two breeds of cattle. **Theriogenology**, v. 21, p. 229 (abstract), 1985.

[18] Segundo a ABNT NRB 6023 - Agosto 2002.

CHUPIN, D.; ROCUREUR, R. Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle: effect of injection regimen. **Animal Reproduction Science**, v. 6, p.11-23, 1985.

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

COGNIÉ, Y.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. **Theriogenology**, v. 25, p.148 (abstract), 1986.

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

D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A.; CAFUERI, C.; TOTEDA, F. Some effects of adding p-LH in defined amounts to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p.91–98, 1997.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**, v.63, p.1764 1774, 2005.

DEMOUSTIER, M. M.; BECKERS, J. F.; VAN DER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, J. L.; ECTOR, F. R. Determination of porcine plasma levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, v. 30, p.379-386, 1988.

D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B. R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, v. 51, p.9–35, 1999.

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

EVANS, C.; ARMSTRONG, D. T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatment. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 70, p.47–53, 1984.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI, J. H. Sincronização de estro e superovulação em cabras e ovelhas. In: **Anais do II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG**, Belo Horizonte – MG, p. 167-195, 2007.

FORCADA, F.; ABECIA, J. A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, M. T.; VALARES, J. A.; PALACÍN, I.; CASACO, A. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrous on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. **Theriogenology,** v.65, p.356-365, 2006.

GARCIA-GARCIA, R. M. Estudio de los efectos del cultivo y la congelación en la viabilidad de los embriones ovinos en estadios previos a la compactación. In: **Study of the effects of culture and freezing on viability of preimplantational embryo stages**. Madrid: INIA Press; 2003.

GONZALEZ-BULNES, A.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B. K.; COCERO, M.J.; GARCIA GARCIA, R. M.; INSKEEP, E. K. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.1 -15, 2004.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. **Theriogenology**, v.58, p.1607-1614, 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; CASTELLANOS, V.; SANTIAGO-MORENO, J.; ARIZNAVARRETA, C.; DOMINGUEZ, V. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. **Reproduction Nutrition Development**, v.43, p.17–28, 2003.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ SEBASTIAN, A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. **Theriogenology**, v. 54, p.1055–1064, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIÁN, A. Effect of follicular development and superovulatory protocol on ovulation rate in ewes. **I Congresso Ibérico de Reprodução Animal**, vol.II: 40-41, Estoril (Portugal), 1997.

GORDON, I. Hormonal control of reproduction in sheep. **Proc Br Soc Animal Production**, v.4, p.79–93, 1975.

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

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v.51, p.155–163, 2004.

HASHEMI, M.; SAFDARIAN, M.; KAFI, M. Estrous response to synchronization of estrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 65, p.279–283, 2006.

HAWK, H. W.; CONLEY, H. H. Sperm transport in ewes administered synthetic progestagen. **Journal Animal Science**, v.33, p.255–256, 1971.

HOFFMAN, K. A.; WALLER, S. L.; YOUNGS, C. R. Once daily versus twice daily treatment with follicle stimulating hormone in ewes synchronizated with different doses of Norgestomet. **Theriogenology**, v. 29, p.261, 1988.

HUHTINEN, M.; RAINO, V.; AALTO, J.; BREDBACKA, P.; MAKI-TANILA, A. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. **Theriogenology**, v.37, p. 457-463, 1992.

HUNTER, M. G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 43(Suppl.), p.91-99, 1991.

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

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

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.93-106, 1991.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p.137–157, 1997.

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

KENDALL, N. R.; GONZALEZ-BULNES, A.; CAMPBELL, B. K. The use of urinary and recombinant human FSH preparations to induce superovulation in sheep and the effect on FSH and LH concentrations. **Annual Meeting Brit Society Animal Science**, v. 59, 2004.

KILLIAN, D. B.; KIESLING, D. O.; WARREN, J. R. Lifespan of corpora lutea induced in estrous-synchronized cycling and anoestrous ewes. **Journal Animal Science**, v.61, p.210, 1985.

KOHRAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L. A. Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. **Theriogenology**, v.43, p.252, 1995.

LIDSELL, C. E.; RAJKUMAR, K.; MANNING, A. W.; EMERY, S. K.; MAPLETOFT, R. J.; MURPLY, B. D. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. **Theriogenology**, v.25, p.167, 1986.

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

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

LÓPEZ SEBASTIAN, A.; INSKEEP, E. K. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. **Liv. Production Science**, v.27, p.177-184, 1991.

MC NATTY, K. P.; LUN, S.; HUDSON, N. L.; FORBES, S. Effect of follicle-stimulating hormone, cholera toxin, pertussis toxin and forskolin on adenosine 3' 5' monophosphate output by granulose cells from Booroola ewes with or without the F gene. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 553-563, 1990.

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

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 2 post ovulation in goats. **Theriogenology**, v. 58, p.1713-1721, 2002.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed., v. 2, Porto Alegre: Sulina, 1978.

MORR, R. M.; OSBORN, J. C.; CROSBY, I. M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **Journal Reproduction and Fertility**, v.74, p.167-172, 1985.

MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W. D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, v. 21, p.117-125, 1984.

NÖEL, B.; BISTER, J. L.; PIERQUIN, B.; PAQUAY, R. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. **Theriogenology**, v.41, p.719–27, 1994.

OKADA, A.; KAMADA, S.; JEON, C.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, n.6, p.397-402, 2000.

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

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Animal Reproduction Science**, v.16, p.81-95, 1988.

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

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

ROMANO, J. E. The effects of continuous presence of bucks on hastening the onset of estrus in synchronized does during breeding season. **Small Ruminants Research**, v.30, p.99-103, 1998.

ROMANO, J. E.; FERNANDEZ ABELLA, D.; VILLEGAS, N. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes. **Applied Animal Behaviour Science**, v.73, p.193-198, 2001.

RUBIANES, E., UNGERFELD, R., IBARRA, D. Use of serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. **Small Ruminant Research**, v.21, p.105 - 111, 1996.

RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S.; CARBAJAL, B.; BENQUET, N.; PINCZAK, A. Superovulatory response to FSH treatments after different progesterone primings in ewes. **Small Ruminant Research**, v.33, p.159-164, 1999.

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

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

SCARAMUZZI, R. J.; DOWNING, J. A.; CAMPBELL, B. K.; COGNIÉ, Y. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. **Australian Journal Biology Science**, v. 41, p.37-45, 1988.

SCUDAMORE, C. L.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; ROBERTSON, I. S. The effect of method of oestrous synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. **Animal Reproduction Science**, v. 34, p.127-133, 1993.

SCHIEWE, M. C.; FITZ, T. A.; BROW, J. L.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F2α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p.19-30, 1991.

SCHRAMM, W.; BOVAIRD, L.; GLEW, M. E.; SCHRAMM, G.; McCRACKEN, J. A. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F2 alpha. **Prostaglandins**, v.26, p.347-364, 1983.

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 and Reproduction**, v. 49, p.1133–1140, 1993.

SELAIVE, A.; MIES FILHO, A. Transferência de óvulos fecundados em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n.4, p.29-34, 1979.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, v.104, n.2-4, p.227-237, 2008.

THOMPSON, J. G. E.; SIMPSON, A. C.; JAMES, R. W.; TERVIT, H. R. The application of progesterone-containing CIDRTM devices to superovulated ewes. **Theriogenology**, v.33, p.1297-1304, 1990.

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

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TRESGUERRES, J. A. F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARRETA, C.; COCERO, M. J. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, p.76-87, 2006.

VIÑOLES, 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.

WARWICK, B.L.; BERRY, R.O.; HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. Proceedings American Society Animal Production, **Annual Meeting**, v.27, p.225-227, 1934.

WHITE, L. M.; KEISLER, D. H.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Characterization of ovine follicles destined to form sub-functional corpora lutea. **Journal Animal Science**, v. 65, p.1595-1601, 1987.

YING S. Y.; MEYER, R. K. Dose dependent pregnant serum mares induced ovulation in immature rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, p.130-140, 1969.