

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA

VETERINÁRIA

**USO DA DESLORELINA PARA CONTROLE DA POPULAÇÃO FOLICULAR
DURANTE TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO EM OVINOS (*Ovis aries*)**

RODRIGO GARCIA

Botucatu - SP

Novembro/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E
RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**USO DA DESLORELINA PARA CONTROLE DA POPULAÇÃO FOLICULAR
DURANTE TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO EM OVINOS (*Ovis aries*)**

RODRIGO GARCIA

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para Exame Geral de Defesa
de Mestrado do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

Botucatu – SP

Novembro/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Garcia, Rodrigo.

Uso da deslorrelina para controle da população folicular durante tratamento superovulatório em ovinos (*Ovis aries*) / Rodrigo Garcia. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Superovulação. 2. Hormônio liberador de gonadotropina. 3. Ovino. 4. Transferência de embriões.

Palavras-chave: Deslorrelina; GnRH; MOET; Ovino; Superovulação.

Nome do autor: Rodrigo Garcia

Título: **USO DA DESLORRELINA PARA CONTROLE DA POPULAÇÃO
FOLICULAR DURANTE TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO EM OVINOS
(*Ovis aries*)**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP

Botucatu /SP

Profa. Dra Arianne Dantas

Membro titular

Etec Dona Sebastiana de Barros, São Manuel/SP

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP

Botucatu /SP

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família toda, meus pais Joaquim Garcia Carrete e Elvira Antônia Pape, pelo apoio incondicional, aos meus irmãos Andre Garcia e Daniel Garcia por todos os bons momentos e todo o companheirismo sempre.

Gostaria também de agradecer à minha esposa Jéssica de Assis Marques, que durante toda a minha vida acadêmica esteve junto me apoiando e incentivando em qualquer que fosse o caminho trilhado.

Aos colegas de residência Viviane Maria Codognoto, Lucas Emanuel Ferreira Canuto, Thaís Cavaleiro, Gabriela Amorim Dantas, e Rafaella Hayashi por todo aprendizado e pela equipe muito unida que formamos.

Agradecimento especial também ao Professor Renan Denadai por todo apoio teórico e prático na execução do projeto, e também ao Professor Sony Dimas Bicudo e à minha orientadora por toda paciência e ajuda durante todas as etapas do projeto.

Aos amigos e colegas de trabalho, em especial a Letícia Salgado por toda força durante a execução.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Controle neuroendócrino da reprodução.....	3
2.2 Fases do ciclo estral de ovelhas	5
2.3 Down regulation.....	6
3. Protocolos de múltiplas ovulações e transferência de embriões em ovinos...8	8
3.1 Fatores para a variabilidade individual à resposta aos protocolos de MOET.....	9
3.2 Acetato de deslorelina	11
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	11
5. REFERÊNCIAS	12
HIPÓTESE	18
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 1.....	19
Effects of pre-treatment with deslorelin on superovulated ewes.....	20
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
1. Introdução	23
2. Materiais e Métodos.....	24
2.1 Animais e local de experimentação	24
2.2 Delineamento experimental.....	25
2.3 Avaliação ultrassonográfica de útero e ovários	26
2.4 Pré-cirúrgico, anestesia e pós-cirúrgico	27
2.5 Coleta de embriões	27
2.6 Análise estatística.....	28
3 Resultados	28
4 Discussão.....	35
5 Conclusão	38
6 Referências.....	38

RESUMO

GARCIA, R. (2019) **Uso da deslorrelina para controle da população folicular durante tratamento superovulatório em ovinos (*Ovis aries*)**

Botucatu – SP. 2019, 51 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

O presente estudo teve por objetivo a utilização do hormônio agonista de GnRH, Deslorelina, para controle da população folicular, com intuito de homogeneizar a onda folicular ao início do tratamento de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET), reduzindo os efeitos deletérios do folículo dominante no tratamento superovulatório com hormônio folículo estimulante, foltropina de pituitária suína. Foram utilizadas 24 ovelhas deslanadas mestiças da raça santa inês, com idades entre 2 e 4 anos, divididas em dois grupos, Controle (Contr), e Deslorelina (Des). Os experimentos foram conduzidos na propriedade rural denominada “Sítio Panorama”, no município de Porangaba-SP, situado na latitude -23.15050993 e longitude -48.09904348, estando a uma altitude de 583m. As ovelhas foram monitoradas ultrassonograficamente por um período de sete dias quanto ao dinâmica de crescimento folicular e presença de corpo lúteo. Após determinação da ciclicidade ovariana todas as ovelhas receberam dispositivo intravaginal com 60mg de medroxiprogesterona no dia 0, que foi substituído por um novo dispositivo no dia 7 e que foi mantido até o dia 14, as fêmeas receberam única dose de 125 µg de clopostenol no dia 7. O tratamento superovulatório foi realizado com aplicação de Hormônio Folículo Estimulante Suíno- pFSH, na dose total de 200mg (10 mL), divididas em oito aplicações decrescentes com intervalo de 12h iniciando no decimo segundo dia (40 e 40; 30 e 30; 20 e 20; 10 e 10 mg, respectivamente). No dia 14 foi aplicada 300 UI de eCG. No grupo deslorrelina além do tratamento descrito acima, foram administradas três doses de 100µg deslorrelina, iniciando no dia 3 após inserção do dispositivo vaginal, repetindo a cada 72 horas. Após 36 horas da retirada do implante de progesterona foi realizada a cobertura natural das fêmeas, utilizando machos com fertilidade comprovada por participação em estação de cobertura obtendo 82% de prenhez, além de atestados aptos à reprodução através de exame andrológico prévio. A coleta de embriões realizou-se no sexto dia após as coberturas, e imediatamente antes à coleta de embriões, foi realizada a laparoscopia para avaliação dos ovários e contagem da quantidade de corpos lúteos formados. Após a coleta os embriões foram quantificados e avaliados quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento. Imediatamente antes da primeira aplicação de FSH, antes das coberturas, e antes da coleta de embriões foi realizada ultrassonografia por via transretal para avaliação dos ovários, a fim de determinar a população folicular ovariana e a presença de corpos lúteos.

Palavras-Chave: MOET, Superovulação, Deslorelina, Ovinos, GnRH

ABSTRACT

GARCIA, R. (2019) **Use of deslorelin to control follicular population during superovulatory treatment in sheep (*Ovis aries*)** Botucatu – SP. 2019, 51 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

The present study main objective was to use the GnRH agonist hormone deslorelin to control ovarian follicular population, achieving this way a more homogenous follicular wave at the beginning of multiple ovulations and embryo transfer (MOET) program, reducing deleterious effects from dominant follicles over the superovulatory protocol with porcine Follicle Stimulating Hormone (pFSH). Twenty four Santa Inês breed sheep were used, aging from 2 to 4 years, and divided into two groups: control (Contr), and Deslorelin (DES). The experiment was conducted in a private property, located in Brazil, São Paulo, City of Porangaba, latitude -23.15050993 and longitude -48.09904348. All sheep were monitored ultrasonographically for seven days, until the presence of a corpus luteum was detected. All sheep received intravaginal sponges containing 60mg of medroxyprogesteron on day 0, and new sponges on day 7 maintained until day 14, among side a single cloprostenol 125 µg dose. Superovulatory treatment was achieved using porcine Follicular Stimulating Hormone -FSH, with the total dose of 200mg (10ml), spread in eight decreasing administrations with 12 hours' interval between them, starting on the twelve day. On day 14, 300 UI of equine chorionic gonadotrophin – eCG was administrated. On the treated group, in addition to the treatment described above, 3 doses of 100µg of GnRH agonist Deslorelin were administrated with 72 hours' intervals, starting at day 4 after sponge insertion (day 3, day 6 and day 9). 36 hours after sponge removal, all sheep were naturally bred with rams of known fertility. Embryo recovery was realized 6 days after sheep's breeding. Immediately before the first FSH administration, before breeding, and before embryo recovery, ovarian ultrasonography was realized to determine population and presence of corpus luteum.

Key-words: MOET, Superovulation, Deslorelin, Sheep, GnRH

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Tratamentos para múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET) podem ser utilizados como ferramentas biotecnológicas objetivando aumentar a progênie de ovelhas de interesse produtivo, auxiliando em programas de seleção e melhoramento genético (MENCHACA et al. 2010, ABECIA et al., 2011; FONSECA et al., 2016).

Fatores intrínsecos e extrínsecos interferem na MOET, como por exemplo a época do ano e fotoperíodo em que se aplica o tratamento, a genética, a condição nutricional, a idade das fêmeas, o protocolo de eleição, além do número de folículos antrais grandes e pequenos ao início das aplicações de pFSH, podendo interferir na resposta ao tratamento, limitando a aplicação em escala comercial da técnica por baixa homogeneidade dentro de um rebanho (BARTLEWSKI et al., 2008, 2009, 2016; QUANT et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017, SOUZA-FABJAN et al., 2017).

A variabilidade individual à resposta ao tratamento, relacionada a aspectos genéticos, na superovulação (SOV), é um dos principais fatores que interferem nos programas de transferência de embriões, sendo a seleção de fêmeas que previamente apresentaram altas taxas de recuperação embrionária um ponto importante para melhoria dos resultados deste programa de reprodução assistida (BRUNO-GALARRAGA et al., 2015).

Brebion e Cognie (1989) descreveram que a população de folículos com diâmetros entre 2 a 3mm no início do tratamento com pFSH apresentou correlação positiva com a produção de embriões após a SOV, porém Bartlewski et al. (2008) não verificaram essa correlação, mas sim uma correlação positiva entre a presença de folículos de 4 mm 12 horas após a primeira aplicação de pFSH e a resposta à SOV. Outros estudos demonstraram que a presença de um folículo >6 mm ao início do tratamento com pFSH, exerce efeito deletério na resposta ao tratamento e produção de embriões transferíveis (RUBIANES et al., 1997; GONZALES-BULNES et al., 2003; 2004), ficando claro dessa forma a interferência do *status* ovariano ao início dos protocolos de SOV.

O tratamento aplicado às doadoras para SOV é baseado na utilização de sistemas de liberação contínua de progesterona natural (P4) (GREEN, 2007),

ou progestágenos (BARTLEWSKI et al., 2017, ZOHARA et al., 2017), e o tratamento pode ser de curta duração, 6 dias (OLIVEIRA et al., 2017) ou de longa duração de 12 a 14 dias (BRUNO-GALARRAGA et al., 2015), não ocorrendo diferença significativa entre o tempo de tratamento e a recuperação embrionária (OLIVEIRA et al., 2017). Anteriormente para estimulação do crescimento folicular utilizava-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG), entretanto obtinha-se menor resposta ovariana e consequente menor número de ovulações, sendo substituído pelo pFSH (SALEHI et al., 2010).

Protocolos utilizando o pFSH contendo variações no intervalo entre as aplicações e nas doses já foram avaliados e atualmente são amplamente utilizados comercialmente, mas existe uma irregularidade nas respostas ao tratamento a nível de rebanho (BARTLEWSKI et al., 2017).

Outros hormônios já foram testados para melhorar a constância na taxa de recuperação embrionárias, como por exemplo o hormônio luteinizante, e os análogos sintéticos do hormônio liberador das gonadotrofinas. Visando uma maior sincronia das ovulações na SOV, e por consequência uma maior fertilização das estruturas, Gharbi et al., (2012), utilizaram o agonista de GnRH buserelina, como tratamento prévio à aplicação de pFSH. O tratamento de 14 dias com buserelina 40 µg/dia, resultou na diminuição no número de folículos dominantes levando a uma resposta ao pFSH em até 50% maior na SOV.

Oliveira et al., (2012) ao utilizar o hormônio luteinizante 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4 com mesmo objetivo que Gharbi et al., (2012) verificaram também maiores taxas de recuperação embrionária também. Análogos do GnRH podem regular a população folicular ovariana e induzir o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular (BALARO et al., 2016; SOUZA-FABJAN et al., 2017), o estradiol 17β também pode ser utilizado com a mesma finalidade (BARTLEWSKI et al., 2017).

Em trabalho realizado por Scagion (2015), ao utilizar o análogo de GnRH deslorelina por via intramuscular, com aplicações de 100µg em intervalos de 48h ou 72h durante 7 dias, constatou ausência de folículos dominantes, por um provável efeito de *down-regulation*, sendo obtido um retorno à ciclicidade em todos os animais após a interrupção das aplicações, sem diferença quanto ao tempo de retorno do crescimento folicular e ocorrência de ovulação em todos os grupos, possibilitando a aplicação desse hormônio para inibir a ocorrência

de folículos dominantes previamente às aplicações de pFSH nos protocolos de SOV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle neuroendócrino da reprodução

O controle da função ovariana é coordenado pela atuação das gonadotrofinas FSH e LH, sintetizadas pela hipófise em resposta a ação do GnRH. Há uma inter-relação complexa entre os hormônios e os folículos, responsáveis pela liberação de inibina e estradiol, o corpo lúteo que produz progesterona, e o útero responsável pela liberação de prostaglandina F2 α (SCARAMUZZI et al., 2011). O hormônio GnRH estimula a liberação das gonadotrofinas FSH e LH pela hipófise anterior. Estes dois hormônios geram um estímulo positivos para o desenvolvimento folicular. (MCNEILLY et al., 1991).

No ovário, com a queda das concentrações de progesterona durante a fase luteal, ocorre um aumento nos pulsos de GnRH e consequente aumento na liberação de LH, o que leva ao aumento da produção de estradiol pelos folículos.

Em contraposição, a concentração de FSH é reduzida pela secreção de estradiol e inibina produzida pelo folículo dominante (BAIRD; MCNEILLY et al., 1981). Esse incremento crescente na concentração de estradiol além de ser responsável pela manifestação do estro nas fêmeas, faz com que a pulsatilidade do LH aumente, o que desencadeará o pico pré ovulatório, ovulação, luteinização do folículo e formação do corpo lúteo (SCARAMUZZI et al., 1993). O corpo lúteo formado é responsável pela secreção de progesterona, que inibe a liberação uterina de prostaglandina, além de suprimir a secreção de GnRH pelo hipotálamo, reduzindo a pulsatilidade do LH (FLINT et al., 1989).

Enquanto a pulsatilidade do LH e a concentração de esteroides é baixa, ocorre elevação dos níveis de FSH (SOUZA et al., 1998). Segundo McNatty et al. (1992), folículos acima de 1 mm de diâmetro em ovelhas são descritos como responsivos às gonadotrofinas e são necessários receptores para FSH nas células da granulosa. Nesse estágio encontram-se folículos de 1 até 2,5 mm com respostas diferentes ao FSH.

Folículos maiores que 2 a 3 mm de diâmetro podem ser considerados dependentes de gonadotrofinas para seu crescimento, e são destes folículos que serão recrutados e selecionados os aptos à ovulação. Para crescerem e passarem de responsivos as gonadotrofinas para dependente as gonadotrofinas, há requerimento de FSH (SCARAMUZZI et al., 2011).

Esse aumento na concentração de FSH é devido ao desaparecimento transitório do *feedback* negativo causado pelo estradiol e inibina, momento esse que não há folículo dominante devido a sua ovulação ou atresia (SOUZA et al., 1998).

PICTON et al., (1990) demonstraram em ovelhas que o FSH sozinho é capaz de estimular o crescimento folicular a tamanhos ovulatórios (5 a 8 mm), fazendo com que o FSH tenha um papel essencial na seleção e desenvolvimento. Porém o LH é necessário para a maturação final do folículo antral, além de ser responsável por desencadear a ovulação e luteinização das células da granulosa e da teca (BAIRD; MCNEILLY et al., 1981).

O folículo será capaz de ovular, caso consiga responder ao crescimento da pulsatilidade de LH, que resulte no pico pré-ovulatório de LH. Entretanto a dominância folicular em pequenos ruminantes é controversa, tendo em vista que mais de um folículo pode adquirir tamanho pré-ovulatório, dentro de uma mesma onda (BARTLEWSKI et al., 1999).

Em bovinos a dominância envolve a produção de hormônios esteroides como o estrógeno, mas também fatores não esteroidais como a inibina, folistatina e fatores de crescimento. Dentre os fatores esteroidais e não esteroidais, o estrógeno e a inibina apresentam-se como os principais responsáveis pelo efeito supressivo da concentração sistêmica de FSH (ADAMS, 1999).

Em estudo realizado por Shidaifat (2001), a estimulação *in vitro* de oócitos com ativina-A demonstrou que esse fator não esteroidal estimulou a proliferação das células da granulosa aumentando a taxa de maturação, além de aumentar a produção de estrógeno e suprimir a luteinização, atuando como um regulador no processo de foliculogênese.

Em contraste, a folistatina reduz a ação da ativina-A e promove a ação de inibina, fazendo com que o ambiente para o recrutamento e o desenvolvimento folicular seja desfavorável (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

2.2 Fases do ciclo estral de ovelhas

O ovino é classificado como poliéstrico estacional, sendo que a duração do período reprodutivo varia conforme a incidência de luminosidade local (fotoperíodo), e a atividade estral tem início no momento em que a duração circadiana da luz diminui. Em áreas tropicais onde a variação anual de horas de luz por dia é menor, a tendência dos ovinos e caprinos é de ciclar regularmente o ano todo. Entretanto existem outros fatores relacionados a ciclicidade em ovinos, como por exemplo a raça, estado nutricional e alimentação (FONSECA, 2005; JAINNUDEN et al., 2004).

O ciclo estral é uma sequência de eventos que se repetem em um intervalo regular de tempo. Em ovelhas a duração do ciclo é de 17 ± 2 dias, e pode ser dividido em fase luteal e fase folicular. Considerando o estro sendo como dia 0, a fase luteal se estende do dia 2 ao dia 13, e a fase folicular do dia 14 até o primeiro dia do próximo ciclo (RUBIANES, 2000).

Segundo HAFEZ et al. (2014), o estresse térmico na região tropical associado à falta de alimento devido à baixa pluviosidade, podem suprimir a atividade reprodutiva, entretanto com o retorno regular de chuvas, os animais retomam a reprodução.

O fotoperíodo nos ovinos envolve um caminho neuroendócrino complexo. A luminosidade captada pelos olhos é transmitida via sistema nervoso monissimpático até o hipotálamo e depois glândula pineal, onde a presença de luminosidade, suprime a liberação de melatonina, gerando um ritmo circadiano de secreção da mesma (SÁ, 2002).

A atividade ovariana ocorre o ano inteiro em ovinos, mesmo com ovelhas em anestro (EVANS & MAXWELL, 1990). BARTLEWSKI et al., (1998) quantificaram estrógeno e progesterona, além de acompanharem ultrassonograficamente ovelhas em anestro e obtiveram variação na concentração desses hormônios, associado ao desenvolvimento e atresia folicular. Entretanto a baixa luminosidade faz com que haja maior liberação de melatonina, modulando os mecanismos inibitórios e retomando a frequência e pulsatilidade de LH, o que gera estímulo ovariano para produção de estrógeno pelos folículos, viabilizando o pico pré ovulatório de LH.

Outro fator decisivo para a estação reprodutiva é a linhagem dos ovinos. Raças europeias (Suffolk, Hampshire, e Texel, entre outras), possuem estação

reprodutiva mais restrita e bem definida nos meses de baixa luminosidade, quando comparada com raças originadas próximas do equador como Dorset (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O cio em ovelhas dura de 24 a 36 horas, e em média a ovulação ocorre de 24 a 27 horas após seu início. A taxa de ovulação varia conforme a idade, raça e estado nutricional. A maior taxa de ovulação ocorre dos 3 aos 6 anos (SCARAMUZZI et al., 2011).

A maioria das ovelhas possui 3 ondas de crescimento folicular, mas há variação de 2 a 4. Essas ondas ocorrem nos dias 0, 6 e 11, sendo que a segunda onda normalmente apresenta folículos de menor diâmetro (GINTHER et al., 1995; LEYVA et al., 1999).

Em estudo realizado por GINTHER et al., (1995), foi observada a ocorrência de pulso de FSH de 1 a 2 dias prévios a emergência da onda folicular, ocorrendo de 4 a 6 dias, o que gera em média 3 ondas. Os dois eventos ocorrem em média a cada 4 dias durante o ciclo reprodutivo ovino.

2.3 Down regulation

O processo de *down regulation* trata-se de uma redução no número de receptores na membrana de uma célula alvo, reduzindo ou abolindo sua resposta a determinado hormônio. O GnRH e seus agonistas podem promover uma dessensibilização hipofisária devido a internalização de seus receptores sem que haja uma resposta compensatória devido a sua degradação ou desacoplamento dos receptores de GnRH ao seu segundo mensageiro intracelular (HUCKLE et al., 1988; SCHNEIDER et al., 2006).

Em estudo realizado por Kauffolk et al. (2010), a utilização de implantes de deslorelina (Suprelorin®) com objetivo de testar a função sexual de suínos, obtiveram uma grande redução na esteroidogênese (testosterona, estrona, estradiol 17B), além da espermatogênese ter sido abolida, devido a um provável efeito de *down-regulation* sob as células pituitárias gonadotróficas.

Em outro trabalho realizado por Taragnat et al. (1998) o tratamento com agonistas de GnRH (buserelina) em ovelhas demonstraram que além de ocasionar o processo de down-regulation, gerou também um esgotamento transitório no estoque de LH. Entretanto, em estudo prévio, Crowder et al. (1986) demonstraram com a infusão contínua de GnRH intravenosa por 24h,

que o efeito de *down-regulation* é um processo transitório e rápido, sendo que o número de receptores para GnRH voltou ao normal 6 h após o fim do tratamento, além de não alterar os estoques hipofisários de LH.

Cognié et al. (2003) destacaram o uso de agonistas e antagonistas de GnRH no uso do controle da população folicular em protocolo superovulatório.

Este conceito foi utilizado por Gharbi et al. (2012), que realizaram pré tratamentos de 14 dias com Buserelina na dose de 40 µg/dia, tendo como resultado uma diminuição expressiva no número de folículos maiores e aumento do número de folículos menores, gerando uma resposta ao FSH exógeno até 50% maior. A divisão dos folículos ao ultrassom foi feita em 3 classes: pequenos (2-3 mm), médios (4-5 mm) e grandes (≥6 mm). O grupo tratado obteve uma resposta positiva, tendo aumento considerável no número de folículos pequenos, e suprimido os folículos médios e grandes. Após a inseminação e colheita de embriões, as fêmeas tratadas obtiveram 40% mais embriões transferíveis do que as fêmeas do grupo controle.

Dufour et al. (2000) utilizaram o antagonista de GnRH antarelix por 10 dias prévios ao tratamento superovulatório em ovelhas da raça Romanov com e sem o gene *Booroola Fec* e obteve redução do número de folículos maiores que 2 mm, colaborando para o tratamento de MOET.

Na tentativa de controlar a população folicular previamente ao tratamento superovulatório em ovelhas da raça santa Inês, Balaro et al. (2016) utilizaram um análogo de GnRH (lecilerina) logo após tratamento de curta duração com progestágenos (6 dias) e obteve redução considerável de folículos dominantes, além do aumento no número de folículos pequenos quando a aplicação do agonista foi realizada 36 h após a remoção das esponjas.

Em trabalho realizado por Scagion (2015), foi utilizado o análogo de GnRH deslorelina, via intramuscular, ou implante subcutâneo de liberação controlada com o intuito de obter uma supressão no crescimento folicular. Todos os tratamentos resultaram em supressão folicular. Após a suspensão do tratamento com deslorrelina ocorreu a sincronização de uma nova onda folicular.

3. Protocolos de múltiplas ovulações e transferência de embriões em ovinos

Os protocolos atuais de superovulação utilizados em pequenos ruminantes envolvem tratamento com progesterona ou progestágenos sintéticos, além do uso de gonadotrofinas específicas ou interespecíficas para a estimulação do crescimento sincrônico de diversos folículos (geralmente iniciado 2 a 3 dias antes do fim do tratamento com progestágenos). Com subsequente cobertura ou inseminação das fêmeas, e colheita cirúrgica dos embriões de 6 a 7 dias depois (SHIPLEY et al., 2007; BARTLEWEKI et al. 2008; SIMONETTI et al. 2008).

A primeira gonadotrofina a ser utilizada a fim de superovular ruminantes, foi o eCG, mas devido a sua ação prolongada (aproximadamente 72 horas *in vivo*) ocorre superestimulação ovariana e, conseqüentemente, a incidência de folículos anovulatórios aumenta, além da produção excessiva de estrógeno (Cognie 1999). Então o eCG foi substituído por extratos de pituitária (ARMSTRONG; EVANS, 1983).

Durante os anos 80, os extratos de pituitária continham uma variação grande na quantidade de LH, o que gerava queda na resposta ovariana, baixos índices de fertilidade, e piora na qualidade dos embriões de ruminantes (Chupin et al., 1987). Entretanto, a partir dos anos 2000, os extratos purificados apareceram no mercado, aumentando a resposta *in vivo* dos protocolos de superovulação, pois o processo de purificação remove o percentual excessivo de LH.

Taxas elevadas de estrógeno alteram o transporte de gametas e a movimentação embrionária inicial no trato reprodutivo, tendo como consequência menores índices de recuperação embrionária (CHAGAS E SILVA et al., 2003; Evans 1984).

Atualmente a gonadotrofina de eleição utilizada comercialmente é o p-FSH (suíno) ou o-FSH (ovino), sendo que esses extratos possuem meia vida curta, e a aplicação deve ser feitas 6 a 8 vezes, com intervalos de 12 h, iniciando 2 ou 3 dias antes da remoção dos pessários impregnados com progesterona (GONZALEZ-BULNES et al., 2000).

O ideal é que a aplicação do FSH seja feita com doses decrescentes, porém algumas empresas produtoras dos extratos purificados, indicam a

aplicação de doses constantes, com intuito de simplificar o protocolo. Em estudo realizado por González-Bulnes et al. (2002), a aplicação em doses decrescentes apresentou um aumento no número de ovulações e número de embriões recuperados e viáveis.

A utilização dos pessários impregnados com progestágeno inibe a secreção de LH e quando mantidos durante 14 dias em ovinos assegura-se que a fêmea submetida ao protocolo tenha luteólise espontânea antes da remoção do implante, tornando dessa forma indiferente a fase em que o protocolo foi iniciado (GOODMAND; KARSH, 1980; ROBINSON, 1967). Entretanto após a inserção do dispositivo intravaginal com progestágeno, a concentração de progesterona plasmática aumenta durante as primeiras 48h, e logo começa a declinar, tornando assim os níveis de progesterona, ao fim do tratamento, baixos para inibir a pulsatilidade de LH, podendo gerar crescimento folicular inadequado com folículos estrogênicos persistentes, ocasionando em falhas no processo de ovulação.

Com objetivo de contornar essa possível falha no protocolo de superovulação, Thompson et al. (1990), demonstraram vantagens no uso de um segundo implante de progesterona, podendo ser inserido ao 7º dia do protocolo e mantido até o 14º dia, associado com uma aplicação de prostaglandina (DINGWALL et al., 1994; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002).

3.1 Fatores para a variabilidade individual à resposta aos protocolos de MOET

Praticamente todas as técnicas de produção e manipulação de embriões em ruminantes domésticos foram desenvolvidas em pequenos ruminantes (Loi et al., 1998) e a inconstância na resposta ovariana aos protocolos de MOET é um fator limitante ao crescimento no emprego desta técnica (BETTERIDGE; SMITH, 1988). Fatores relacionados com a situação fisiológica do animal (fatores intrínsecos) como por exemplo a idade, situação nutricional, diferenças genéticas e condição ovariana no momento do tratamento, podem influenciar na consistência da técnica.

Outros fatores como época do ano, fotoperíodo e secreção de melatonina, constituem os fatores extrínsecos (GONZALES-BULNES et al. 2004), e também interferem na resposta.

Dentre todos os fatores, a genética da fêmea ovina é o que mais altera sua resposta a MOET. Animais de linhagens prolíficas geralmente demonstram respostas superiores aos tratamentos de superovulação, e conseqüentemente maior número de embriões viáveis (BINDOM et al., 1986).

A idade também interfere no resultado, sendo que animais muito jovens (pré púbere) apresentam respostas inferiores quando comparados a animais sexualmente maduros, e segundo Torres e Sevellec (1987) a idade com a maior média de embriões colhidos é aos 6 anos.

Em bovinos, foi demonstrado que a presença de um folículo dominante pode ser um fator limitante para uma resposta satisfatória ao tratamento superovulatório (GUILBAULT et al., 1991; HUHTINEN et al., 1992; BUNGARTZ; NIEMANN, 1994; Lussier et al., 1995). Guilbault et al. (1991) demonstraram que quando o protocolo é iniciado sem a presença de um folículo dominante, a taxa de ovulação é maior, e ocorria menor variação no número de ovulações quando comparado ao tratamento na presença de um folículo dominante. Entretanto o efeito de um folículo dominante em ovinos e caprinos é controverso, segundo Ginther et al. (1989) o mecanismo de dominância é diferente entre bovinos e ovinos, sendo que nos bovinos a alta concentração de inibina e estrógeno, inibe o crescimento de outros folículos e impede a emergência de novos folículos (Fortune, 1994), e em ovinos os folículos pré ovulatórios inibem o crescimento de outros folículos no ovário no momento da emergência folicular sendo que o aparecimento de novos folículos em crescimento foi diminuído, porém não inibido, e seu crescimento subsequente suprimido (González-Bulnes et al. 2001).

Outro fator intrínseco que impacta a quantidade de embriões colhidos, é o número de folículos antrais pequenos (2-3mm) e o número de folículos antrais grandes (≥ 6 mm) no início do tratamento superovulatório (Cognie et al. 1999). Segundo Brebion e Cognie (1989), a quantidade de folículos antrais pequenos na primeira aplicação de p-FSH/o-FSH é representativo de quantos folículos são potencialmente responsivos ao FSH e, portanto, capazes de crescerem a tamanhos de folículos pré-ovulatórios. Brebion e Cognie (1989) também relataram uma correlação positiva entre número de folículos pequenos ao início do tratamento superovulatório, taxa de ovulação e recuperação de embriões viáveis.

Segundo González-Bulnes et al. (2002), os protocolos utilizando gonadotrofinas exógenas estimulam um número grande de folículos a se desenvolverem, e alguns desses folículos podem estar em estágio inicial de atresia e apesar de folículos atrésicos responderem ao estímulo hormonal, acabam tendo desenvolvimento inadequado, gerando falhas no processo de ovulação (RUBIANES et al., 1997).

3.2 Acetato de deslorelina

A deslorelina é um sintético análogo agonista de GnRH, e sua potência biológica é cerca de 150 vezes maior e além de ser mais estável, possui baixa degradação, se liga com alta afinidade às células da pituitária anterior, e é mais resistente a proteólise do que o GnRH nativo. Este fármaco possui capacidade de estimular 7 vezes mais liberação de LH do que o GnRH natural, e é 7 vezes mais potente do que a buserelina (CONCANNON, 2005; COY; SCHALLY, 1978; KARTEN; RIVIER, 1986).

A deslorelina tem sido usada em diversas espécies domésticas, com intuito de controle reprodutivo. Em equinos é amplamente utilizada na rotina como indutora de ovulação (MCCUE et al., 2007).

Devido a sua forte ligação aos receptores e degradação lenta, a deslorrelina pode ser usada como anticoncepcional de efeito transitório, por gerar um efeito de down-regulation. Os implantes impregnados com deslorrelina inibem a liberação de gonadotrofinas e hormônios sexuais em cães, podendo ser utilizados com efeitos temporário de 6 meses a 1 ano, e reversíveis (TRIGG et al., 2001).

Biologicamente seu efeito pode ser dividido em duas fases: A primeira na qual há liberação de gonadotrofinas pela hipófise, ocasionando desenvolvimento folicular ou ovulação, e a segunda fase em que há bloqueio dos pulsos de LH, até que a ação do agonista seja removida (D'OCCHIO et al., 2000).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação folicular, em especial a dominância exercida pelos folículos maiores é um dos desafios a serem vencidos para que os protocolos de MOET tornem-se de fato uma técnica de uso rotineira, e nesse contexto os agonistas

de GnRH podem ser estudados como uma ferramenta para controlar a população folicular, padronizando-a e reduzindo os efeitos deletérios da dominância durante a superovulação.

5. REFERÊNCIAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; & GONZÁLEZ-BULNES A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.27, p.67–79, 2011.

ADAMS, G.P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.17-32, 1999.

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

BAIRD, D.T.; MCNEILLY, A.S. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrus cycle of the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.30, p.119-33, 1981.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.111-24, 1999.

BARTLEWSKI, P.M.; ALEXANDER, B.D.; RAWLINGS, N.C.; BARRET, D.M.W.; KING, W.A. Ovarian responses, hormonal profiles and embryo yields in anoestrous ewes superovulated with Folltropin - V after pretreatment with medroxyprogesterone acetate-releasing vaginal sponges and a single dose of oestradiol-17B. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p.299-307, 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; SEATON, P.; FRANCO OLIVEIRA, M. E.; KRIDLI, R. T.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v.86, p.130–143, 2016.

BARTLEWSKI, P. M.; SOHAL, J.; PARAVINJA, V.; BABY, T.; OLIVEIRA, M. E. F.; MURAWSKI, M.; KEISLER, D. H. Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in sheep? **Domestic Animal Endocrinology**, v.58, p.30–38, 2017.

BETTERIDGE, K.J.; SMITH. C. Extending the use of embryo transfer in farm animals. In: The proceedings of 11th international congress on animal reproduction and artificial insemination (AI). Dublin, p.255-264, 1988.

BINDOM, B.M.; PIPER, L.R.; CAHILL, L.P.; DRAIN COURT, M.A.; O'SHEA, T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. **Theriogenology**; v.25, p.53-70, 1986.

BREBION P., COGNIE Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. **Proceedings of the 5th Meeting on European Embryo Transfer Association**, (EETA'89), Lyon, France; p. 106-106, 1989.

BRUNO-GALARRAGA, M.; CUETO, M.; GIBBONS, A.; PEREYRA-BONNET, F.; SUBIABRE, M.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. **Theriogenology**, v.84, p.784–790, 2015.

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

CHAGAS E SILVA J.; LOPES DA COSTA, L.; CIDADÃO, R.; ROBALO SILVA, J. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. **Theriogenology**, v.60, p.521-32, 2003.

CHUPIN, D.; COGNIE, Y.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R.; SAUMANDE, J. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: Roche JF, O'Callaghan D. editors. Follicular growth and ovulation rate in farm animals. **The Hague: Martinus Nyhoff**, p. 63-71, 1987

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.105-16, 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of 1026 embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-88, 2003.

CONCANNON, P. W. Estrus induction in dogs: approaches, protocols and applications. In: **World Congress of the World Small Animal Veterinary Association**, 2005.

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

CROWDER, M.E.; HERRING, R.D.; NETT, T.M. Rapid recovery of gonadotroph function after down-regulation of receptors for GnRH in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.577-85, 1986.

D'OCCHIO, M.J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T.R.; ASPDEN, W.J.; TRIGG, T.E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.433–42, 2000.

DINGWALL, W. S., MCKELVEY, W. A. C., MYLNE, M. J. A., SIMM, G. A protocol for MOET in suffolk ewes. **'45th Annual Meeting of the European association of Animal Production**, Edinburgh. pp. S2-4, 1994.

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

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

FLINT, A.P.F.; SHELDRIK, E.L.; JONES, D.C.S.; AULETTA, F. J. Adaptations to pregnancy in the interactions between luteal oxytocin and the uterus in ruminants. **Journal Reproduction Fertility**, v.37, p.195-204, 1989

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v.16, 2005.

FONSECA, J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; OLIVEIRA, M.E.F.; LEITE, C.R.; NASCIMENTO-PENIDO, P.M.P.; BRANDÃO, F.Z.; LEHLOENYA, K.C. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.86, p.144–151, 2016.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**. v.50, p.225-232, 1994.

FURMAN, B. L. Deslorelin. **Reference Module in Biomedical Science**, 2017.

GHARBI, I.; FERROUK, M.; DECHICHA, A.; BARIL, G.; BECKERS. J.F.; GUETARNI, D. Follicular status and embryo production in ouled Djellal (Algeria) ewes breed pretreated with a GnRH Agonist. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.6, p.791-98, 2012.

GINTHER, O. J., KNOFF, I., AND KASTELIC, I. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v.3, p.689-703. 1995.

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.1055-64, 2000.

GONZÁLEZ-BULNES, A., SANTIAGO-MORENO, J., GARCIA-GARCIA, R. M., DEL CAMPO, A., GÓMEZ-BRUNET, A., AND LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on the growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.265-272, 2001.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J. H.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.;

BAIRD, D. T. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. **Theriogenology**, v.57, p.1263-1272, 2002.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCÍA-GARCÍA, R.M.; SOUZA, C.J.H.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; MCNEILLY, A.S. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology**, v. 57, p.1263–1272. 2002.

GONZALEZ-BULNES A, BAIRD DT, CAMPBELL BK, COCERO MJ, GARCIA-GARCIA RM, INSKEEP EK, et al. 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.

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

GUILBAULT, L.A. GRASSO, F., LUSSIER, J.G., ROUILLIER, P., MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal Reproduction Fertility**, v.91, p.81-89, 1991.

HUCKLE, W.R.; CONN, P.M. Molecular mechanisms of gonadotropin releasing hormone action: II. The effector system. **Endocrine Reviews**, v.9, p.387–95, 1988.

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

JAINNUDEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, v.7 p.173-182, 2004.

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

KAUFFOLD, J., ROHRMANN, H., BOEHM, J., & WEHREND, A. Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars. **Theriogenology**, v.74, p733–740, 2010.

LOI P, PTAK G, DATTENA M, LEDDA S, NAITANA S, CAPPAL P. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. **Reproduction Nutrition Development**; v.38, p.615-28, 1998.

MCCUE, P. M., MAGEE, C., & GEE, E. K. Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, 58–61, 2007.

MCNEILLY AS, PICTON HM, CAMPBELL BK, BAIRD DT. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.43:177–86, 1991.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.113-118, 2010.

ROBINSON T. J. 'The control of the ovarian cycle in sheep.' **Sydney University Press: Sydney, Australia**, p. 237-244, 1967.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑOLES, C.; RIVERO, A.; ANDADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, v.47, p.1479–88. 1997

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiología reprodutiva em cabras y ovejas. **Simpósio Sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes**, São Paulo. Anais... São Paulo: FMVZ/USP, 2000.

SÁ, C.O. Manejo reprodutivo para intervalo entre partos de oito meses. In: **VI Simpósio Paulista de Ovinocultura**, p.8-20, 2002.

SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; HENDERSON, K.K.M.; MARTIN, G.B.; McNATTY, K.P.; McNELLY, A.S.; TSONIS, C.G. A model for follicular selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.459-78, 1993.

SCAGION, L.F.S. Supressão temporaria do crescimento folicular ovariano em ovelha pela administração continuada de deslorelina na forma injetável ou implante de liberação controlada. Botucatu, 2015. 72f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; McNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGER, P.; MONNIAUX, D.; VINOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.444–67, 2011.

SCHNEIDER, F., TOMEK, W., GRÜNDKER, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. **Theriogenology**, v.66(4), p.691–709, 2006.

SHIDAIFAT, F., KHAMAS, W., HAILAT, N. Activin-A differentially regulates steroidogenesis by sheep granulosa cells. **Research in Veterinary Science**, v.71, p.23–25, 2001.

SHIPLEY CFB, BUCKRELL BC, MYLNE MJA, POLLARD J, HUNTON JR. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In Youngquist RS, Threlfall WR, editors. **Current therapy in large animal Theriogenology** 2. Saint Louis, Mo: Saunders/Elsevier; p. 629-41, 2007.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O.E.; CAROU, N.; ALBERIO, R.H.; ABECIA, J.A.; Simplified superovulatory treatments in corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**; v.104, p.227-37, 2008.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; DA ROSA, R. M.; BALARO, M. F. A.; PINTO, P. H. N.; DOS SANTOS, G. B.; ARASHIRO, E. K. N.; BRANDÃO, F.Z. Effect of different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. **Theriogenology**, v.103, p.24–29, 2017.

TARAGNAT, C.; BERNIER, A.; FONTAINE, J. Gonadotrophin storage patterns 1324 in the ewe during the oestrous cycle or after long-term treatment with a GnRH agonist. **Journal of endocrinology**, v.156, p.149-57, 1998.

TORRES S, SEVELLEC C. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**, v.27 p.859-63, 1987.

TRIGG, T.E.; WRIGHT, P.J.; ARMOUR, A.F.; WILLIAMSON, P.E.; JUNAIDI, A.; MARTIN, G.B.; DOYLE, A.G.; WALSH, J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, p.255-61, 2001.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717–1751, 2005.

ZOHARA, B. F.; AZIZUNNESA, ISLAM, M. F.; ALAM, M. G. S.; BARI, F. Y. Survival of embryos after transfer within multiple ovulation and embryo transfer (MOET) program. **Small Ruminant Research**, v.149, p.11–15., 2017

HIPÓTESE

A aplicação de deslorelina a cada 72h, em 3 aplicações de 100µg cada será eficaz para inibir a presença de folículos dominantes ao início ao tratamento superovulatório com FSH e aumentar o número de embriões obtidos.

OBJETIVOS

Determinar se a utilização da deslorelina a cada 72 horas em 3 aplicações no protocolo de MOET em ovelhas é capaz de controlar a população folicular ovariana levando a ausência do folículo dominante no momento do início do tratamento com pFSH e se este efeito pode elevar a quantidade de corpos lúteos formados, taxa de recuperação embrionária e qualidade dos embriões.

CAPÍTULO 1

Effects of pre-treatment with deslorelin on superovulated ewes

(Artigo redigido e submetido segundo as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals* <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/14390531/2019/54/11>)

Rodrigo Garcia^{1*}, Renan Denadai¹, Viviane Codognoto¹, Letícia Salgado¹,
Suzane Brochine¹, Eunice Oba¹

São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal
Science, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology,
Botucatu

*Corresponding author at: Department of Animal Reproduction and Veterinary
Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, FMVZ, São Paulo State University
(UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil. E-mail: rodrigogarcia_vet@hotmail.com

¹These authors have contributed equally to this work.

RESUMO

O presente estudo testou a utilização do hormônio agonista de GnRH, deslorelina para controle da população folicular previamente ao início do tratamento de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET). Foram utilizadas 24 ovelhas mestiças da raça santa inês, com idades entre 2 e 4 anos, divididas randomicamente em dois grupos, controle (n=11) e tratado (n=13). Todas as ovelhas receberam dispositivo intravaginal com 60 mg de medroxiprogesterona no dia 0, e um novo dispositivo no dia 7, o qual foi mantido até o dia 14. As fêmeas também receberam uma dose de 125 µg de cloprostenol no dia 7. O tratamento superovulatório foi feito com aplicação de 200 mg de pFSH, divididos em oito aplicações decrescentes com intervalo de 12h iniciando no 12º dia. No dia 14 foi aplicada 300 UI de eCG. No grupo deslorelina além do tratamento descrito acima, foram administradas três doses de 100 µg de deslorelina, iniciando no dia 3 após inserção do dispositivo vaginal, repetindo aplicação após 72 e 144 horas. Após 36 horas da retirada do implante de progesterona foi realizada a cobertura natural das fêmeas, utilizando machos com fertilidade comprovada. A colheita de embriões realizou-se no 6º dia após as coberturas, e os produtos foram quantificados e avaliados quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento. Nos dias 12, 16 e 21 foi realizada ultrassonografia por via transretal para avaliação dos ovários, a fim de determinar a população folicular ovariana e a presença de corpos lúteos. Ovelhas do grupo controle obtiveram maior recuperação embrionário ($P<0,01$) do que o grupo tratado (5,18 embriões contra 1,07 embriões por doadora), diferindo no número de mórulas apenas. O número de corpos lúteos ($P<0,01$), foi maior no grupo controle (10,44 contra 4,5 corpus lúteos por ovelha), entretanto o número de folículos foi significativamente maior ($P<0,05$) no grupo tratado do que no grupo controle no primeiro dia de aplicação de pFSH (5,5 folículos contra 3,0 folículos por ovelha). A inclusão de deslorelina no protocolo de SOV embora tenha resultado em maior sincronização na apresentação de estro e média de folículos, não induziu o aumento de número de corpos lúteos e embriões colhidos.

Palavras-chave: Deslorelina, MOET, Ovelha, Dinâmica folicular

ABSTRACT

The present study assessed the effect of GnRH agonist deslorelin to control follicular population previously to multiple ovulation and embryo transfer (MOET) protocol in sheep. 24 santa inês breed ewes were used in this experiment, from 2 to 4 years old. All sheep received intravaginal sponges containing 60mg of medroxyprogesterone on day 0, and new sponges on day 7 maintained until day 14, among side a single Cloprostenol 125 µg dose. Superovulatory treatment was achieved using porcine Follicular Stimulating Hormone pFSH, with the total dose of 200 mg (10ml), spread in eight decreasing administrations with 12 hours' interval between them, starting on the twelve day. On day 14, 300 UI of equine chorionic gonadotrophin –eCG was administrated. On the treated group, in addition to the treatment described above, 3 doses of 100µg of GnRH agonist deslorelin were administrated with 72 hours' intervals, starting at day 4 after sponge insertion (day 3, 6 and 9). 36 hours after sponge removal, all sheep were naturally bred with rams of known fertility. Embryo recovery was realized 6 days after sheep's breeding. Immediately before the first pFSH administration, before breeding, and before embryo recovery, ovarian ultrasonography was realized to determine population and presence of corpus luteum. Ewes from group control had a greater embryo recover ($p<0.01$) then treated group (5,18 against 1,07 embryos per donor), the ovulation rate from control group was also higher ($p<0.01$) compared to treated group (10,44 against 4,5 ovulations per ewe), although the number of total follicles was significantly higher ($p<0,05$) on treated group on the first day of FSH (5,5 follicles per ewe against 3 per ewe). The conclusion of this experiment was that the administration of 100 µg of deslorelin with 72h intervals reduced the number of recovered embryos and the number of total corpus luteum in ewes.

Key words: Deslorelin, MOET, Sheep, Follicular dynamics

1. Introdução

Tratamentos de superovulação (SOV) podem ser utilizados como ferramentas biotecnológicas objetivando aumentar a progênie de ovelhas de interesse produtivo, auxiliando em programas de seleção e melhoramento genético (Menchaca et al. 2010, Abecia et al., 2011; Fonseca et al., 2016).

Fatores intrínsecos e extrínsecos interferem na MOET, resultando em respostas pouco homogêneas, podendo se tornar um limitante a aplicação comercial da técnica (Bartlewski et al., 2008, 2009, 2016; Oliveira et al., 2017).

Dentre os fatores intrínsecos, a variabilidade individual, relacionada com aspectos genéticos, em relação a resposta ao tratamento superovulatório, é um dos principais fatores que interferem nos programas de transferência de embriões, sendo a seleção de fêmeas que previamente apresentaram altas taxas de recuperação embrionária um ponto importante para melhoria dos resultados do programa de reprodução assistida (Bruno-Galarraga et al., 2015).

Outro fator intrínseco é a população de folículos com diâmetro entre 2 e 3 mm no início do tratamento com pFSH, que apresenta correlação positiva com a produção de embriões após a superovulação (Brebion; Cognie, 1989), além da presença de folículos de 4 mm, 12 horas após a primeira aplicação de pFSH que também apresenta correlação positiva com a resposta à superovulação (Bartlewski et al., 2008). Somado a isso, a presença de um folículo >6mm ao início do tratamento com FSH, interfere negativamente quanto a respostas ao tratamento e produção de embriões transferíveis (Rubianes et al., 1997; Gonzales-Bulnes et al.; 2004).

A sincronização do estro das doadoras é realizada utilizando de sistemas de liberação contínua de progesterona natural (P4) (Green, 2007;

Souza-Fabjan et al., 2017), ou progestágenos (Bartlewski et al., 2017, Zohara et al., 2017), o tratamento pode ser de curta duração, 6 dias (Oliveira et al., 2017) ou de longa duração de 12 a 14 dias (Bruno-Galarraga et al., 2015), não há diferença significativa entre o tempo de tratamento e a recuperação embrionária (Oliveira et al., 2017).

Análogos do GnRH podem regular a população folicular ovariana e induzir o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular com ausência ou menor número de folículos dominantes (Balaro et al., 2016; Souza-Fabjan et al., 2017; Gharbi et al., 2012). O estradiol 17 β também pode ser utilizado com a mesma finalidade (Bartlewski et al., 2017).

Desta maneira, o presente estudo tem por objetivo utilizar o análogo de GnRH acetato de deslorelina como ferramenta para reduzir o número de folículos dominantes e consequentemente aumentar a taxa de resposta aos protocolos tradicionais de superovulação e transferência de embriões em ovinos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e local de experimentação

O experimento foi conduzido no período de estação reprodutiva, no mês de janeiro, em criação comercial, na latitude - 23.15050993 e longitude - 48.09904348 e numa altitude de 583 m.

Foram utilizadas 24 ovelhas com idades entre 2 e 4 anos, peso médio de 45kg, mestiças da raça Santa Inês, mantidas sob regime extensivo em pastagens de aruana (*Panicum sp*), com sal mineral *ad libitum* durante todo o período pré-cirúrgico do estudo. As ovelhas foram avaliadas

ultrassonograficamente durante 7 dias quanto a dinâmica de crescimento folicular e presença de corpo lúteo para constatação de ciclicidade.

2.2 *Delineamento experimental*

Após determinação da ciclicidade pela visualização ao ultrassom de pelo menos um corpo lúteo por animal, as ovelhas foram divididas randomicamente em dois grupos, controle (n=11), e tratado (n=13), todas receberam dispositivo intravaginal com 60mg de medroxiprogesterona no dia 0, e um novo dispositivo no dia 7, o qual foi mantido até o dia 14. As fêmeas receberam única dose de 125 µg de cloprostenol no dia 7. O tratamento superovulatório foi realizado com aplicação de pFSH, na dose total de 200 mg (10 ml), divididas em 8 aplicações decrescentes com intervalo de 12 h iniciando no 12º dia (40 e 40; 30 e 30; 20 e 20; 10 e 10 mg, respectivamente). No dia 14 foi aplicada 300 UI de eCG. No grupo tratado além do tratamento descrito acima, foram administradas três doses de 100 µg deslorelina, iniciando no dia 3 após inserção do dispositivo vaginal, repetindo aplicação após 72 (D6) e 144 horas (D9). A rufiação das fêmeas foi iniciada 24 horas após a remoção do segundo implante de progesterona, e foram cobertas conforme aceitavam o macho. Os machos utilizados tinham fertilidade comprovada através de uso em estação de monta prévia com nascimento de produtos viáveis, e exame andrológico para constatar aptidão reprodutiva no momento do experimento. A colheita dos embriões foi realizada no 6º dia após as coberturas. Antes da colheita de embriões, durante procedimento de laparotomia, foram contados *in situ* todos os corpos lúteos presentes nos ovários de cada ovelha. Após a colheita, os embriões foram quantificados e avaliados quanto à qualidade e estágio de

desenvolvimento (Stringfellow e Seidel, 1998). Imediatamente antes da primeira aplicação de pFSH, antes das coberturas, e antes da colheita de embriões foi realizada ultrassonografia por via transretal para avaliação dos ovários, a fim de determinar a população folicular ovariana e a presença de corpos lúteos (Figura 1).

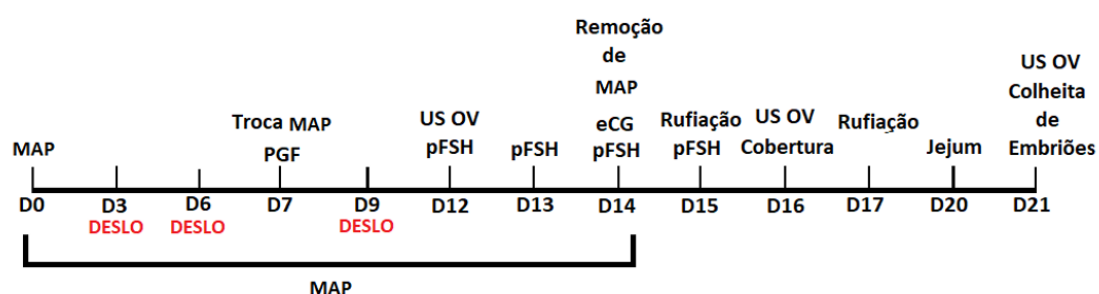


Figura 1. Representação esquemática do tratamento de múltiplas ovulações e colheita de embrião utilizado no experimento. CIDR – Dispositivo interno de liberação controlada. MAP - Medroxiprogesterona. US OV – Ultrassom ovariano. pFSH – duas aplicações por dia, com intervalos de 12h. eCG – Gonadotrofina coriônica equina. PGF – Prostaglandina F2α (Cloprostenol). DESLO – Deslorelina aplicada apenas no grupo Tratado.

2.3 Avaliação ultrassonográfica de útero e ovários

Após remoção das fezes da ampola retal, preenchimento total da mesma com solução aquosa de carboximetilcelulose, utilizando equipamento Aloka® Prosound 2 VET equipado com transdutor linear prostático de frequência 7,5MHZ (Modelo UST -660-7,5), o trato reprodutivo foi avaliado a ecotextura dos ovários e as características anotadas. Foram aferidas as medidas dos folículos ovarianos encontrados e a média das medidas foliculares foi calculada

para determinar o diâmetro, classificando os folículos como pequenos (diâmetro <2 mm), médios (diâmetro de 2,1 a 4 mm), grandes (diâmetro de 4,1 a 6 mm), e pré ovulatórios ($\geq 6,1$ mm).

2.4 Pré-cirúrgico, anestesia e pós-cirúrgico

Previamente a todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas.

As ovelhas foram anestesiadas com a associação de cetamina 5,0 mg/kg e cloridrato de xilazina 0,2 mg/kg. A anestesia peridural com 4 mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor. No local de introdução da linha de incisão para exposição uterina, foi realizado bloqueio local com lidocaína 2% com vaso constritor.

Imediatamente após os procedimentos foi aplicada 30.000 UI/kg de penicilina G benzatina (Pentabiótico®, Zoetis) repetida a cada 72 horas durante 7 dias e 2.2 mg/kg de flunixin meglumine (Banamine®, MSD) a cada 24 horas por 3 dias. Sobre a ferida cirúrgicas foi aplicado iodopolividona tópica e repelentes, diariamente até a retirada dos pontos no 10º dia após o procedimento.

2.5 Coleta de embriões

Com o animal em decúbito dorsal realizou-se tricotomia na região abdominal e antissepsia com solução de clorexidine degermante a 2% e álcool. Uma incisão de pele retro umbilical de aproximadamente sete centímetros foi feita com bisturi número 4, em seguida divulsão dos tecidos musculares, até a visualização e abertura do peritônio para exposição dos cornos e corpo do útero. Os cornos uterinos foram lavados individualmente através da inserção de

cateter de foley No 8, próximos a bifurcação e cateter 20G próximo a junção útero tubárica.

Cada corno uterino foi lavado com 45 mL de PBS (tampão fosfato salina) pré-aquecido e suplementado com 1% de soro fetal bovino, em ciclos de lavagens de 15 mL cada. A solução foi aplicada pelo cateter e o líquido resultante colhido pelo cateter de foley. Após finalizada manipulação uterina, foi instilada no útero solução fisiológica heparinizada aquecida a 37°C, a fim de evitar aderências.

O fluido obtido da lavagem uterina foi depositado em placas de petri e os embriões foram identificados em estereomicroscópio

2.6 *Análise estatística*

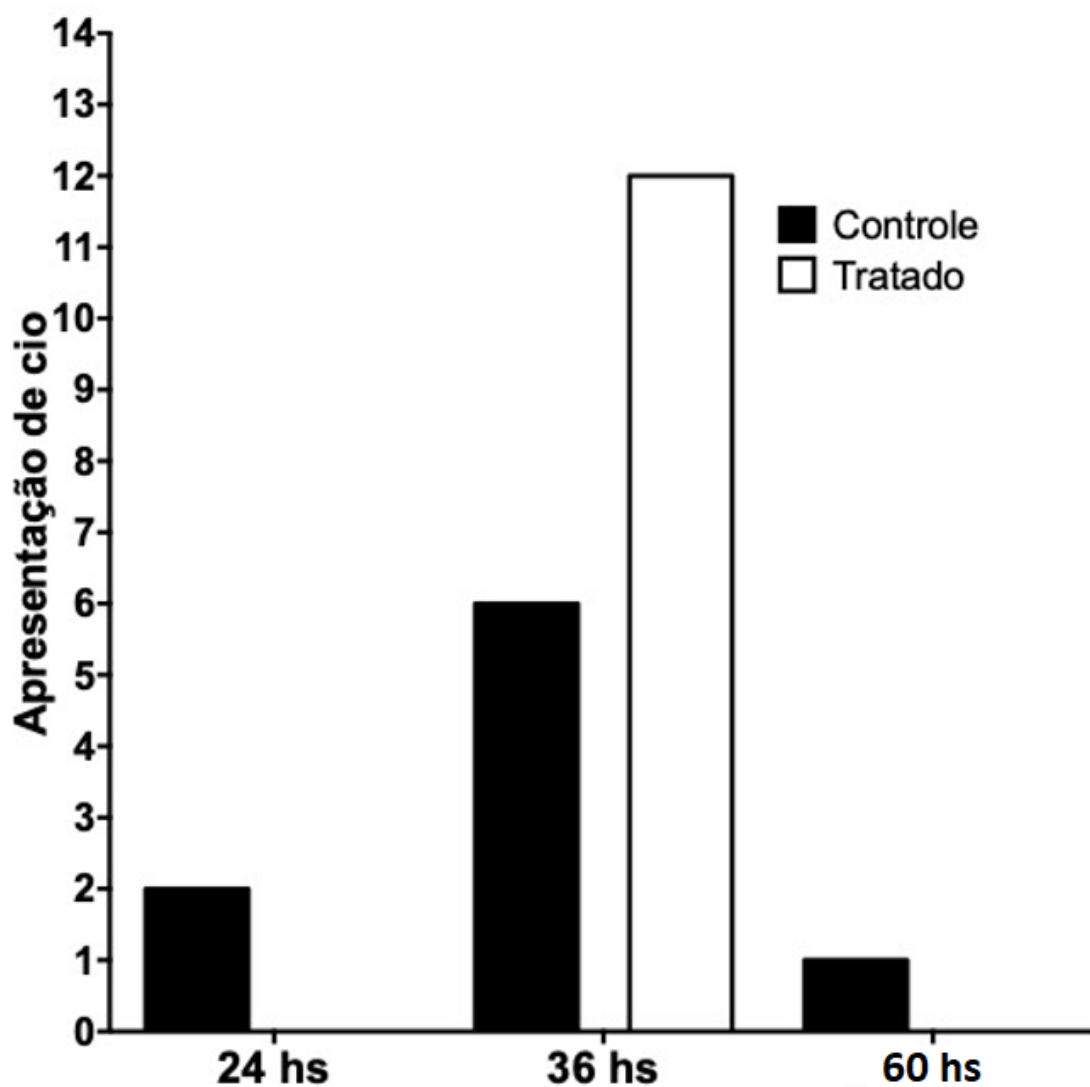
Para comparar os dados referentes aos parâmetros de total de ovulações, número total de corpos lúteos *in vivo* e ao ultrassom, e total de embriões colhidos, foi utilizado o test t de Student. Para comparação dos grupos nos parâmetros de tamanho folicular e estágio de desenvolvimento dos embriões coletados, foi utilizada a análise de variância (anova), seguido do teste de Dunnet. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc.). Comparações com $P < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3 **Resultados**

Com relação à início da apresentação de estro, foi observado no grupo controle uma taxa de 18,2% (n=2) de ovelhas com receptividade ao macho 24 horas após a remoção do implante, 54,5% (n=6) com receptividade 36 horas

212 após a remoção do implante, e 9,1% (n=1) com aceitação ao macho 60 horas
213 após a remoção do implante. Já no grupo Tratado observou-se 92,3% (n=12)
214 das ovelhas aceitaram o macho, 36 horas após a remoção do implante de
215 liberação controlada de progesterona (Fig. 2)

216



217

218 **Figura 2.** Aceitação do macho após 24, 36 ou 60 horas de remoção do
219 implante de progesterona.

220

O número de corpos lúteos, que foram confirmadas *in situ* no momento da colheita de embriões com visualização dos ovários, o grupo Controle obteve diferença significativa ($P < 0,01$) quando comparado ao grupo Tratado (10,09 por animal contra 4,75; respectivamente). (Fig. 3)

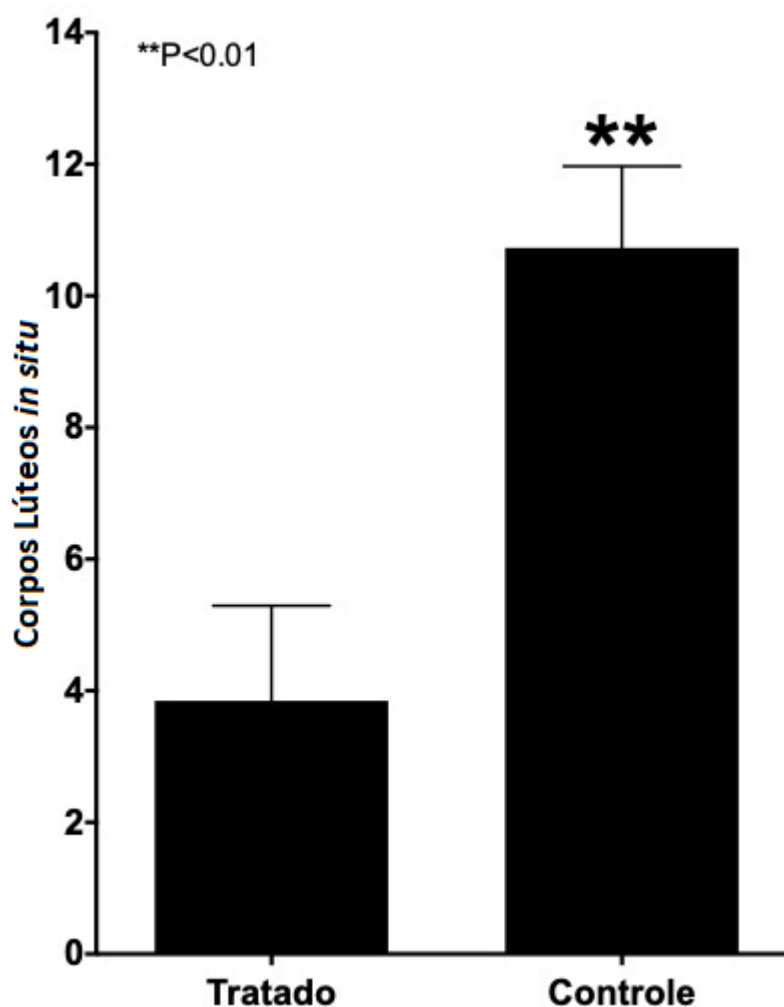


Figura 3. Número médio de corpos lúteos por animal no grupo Tratado e grupo Controle

Obteve-se uma correlação positiva do número de corpus lúteos ao ultrassom e o número de corpos lúteos observados *in situ*, no momento cirúrgico, de 86,4% (Fig. 4)

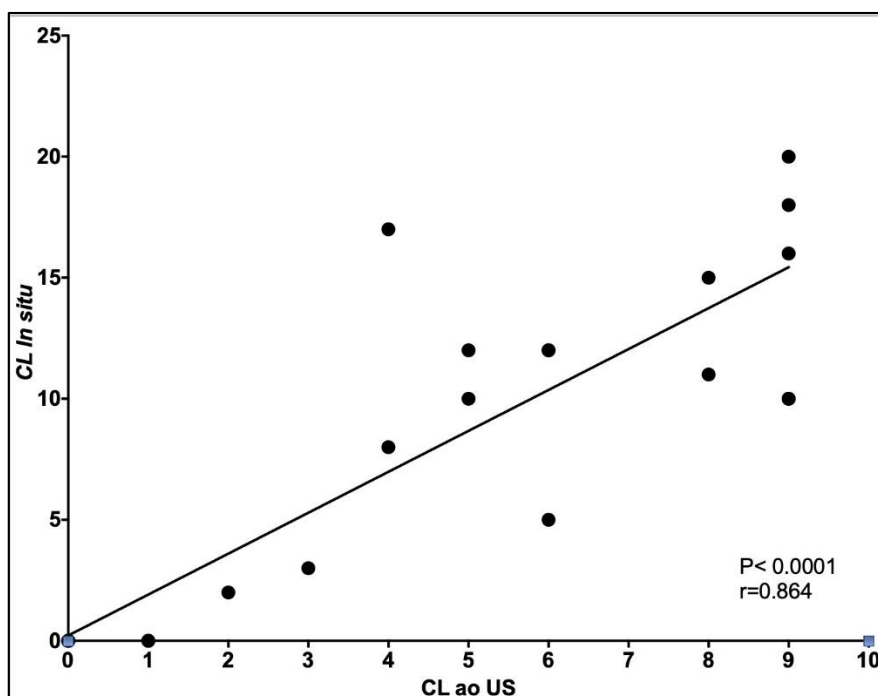


Figura 4. Correlação entre corpos lúteos ao ultrassom (CL ao US), e corpos lúteos *in situ* (CL *in situ*).

O número médio de folículos no exame ultrassonográfico no 1º dia de tratamento com pFSH (D12) referente à período pós-tratamento com deslorelina, diferiu nos grupos Controle e Tratado, obtendo 5,5 folículos por animal no grupo Tratado, e 2,72 folículos por animal no grupo Controle. Observa-se diferença significativa no número de folículos de 2,1 a 4 mm (Fig. 5).

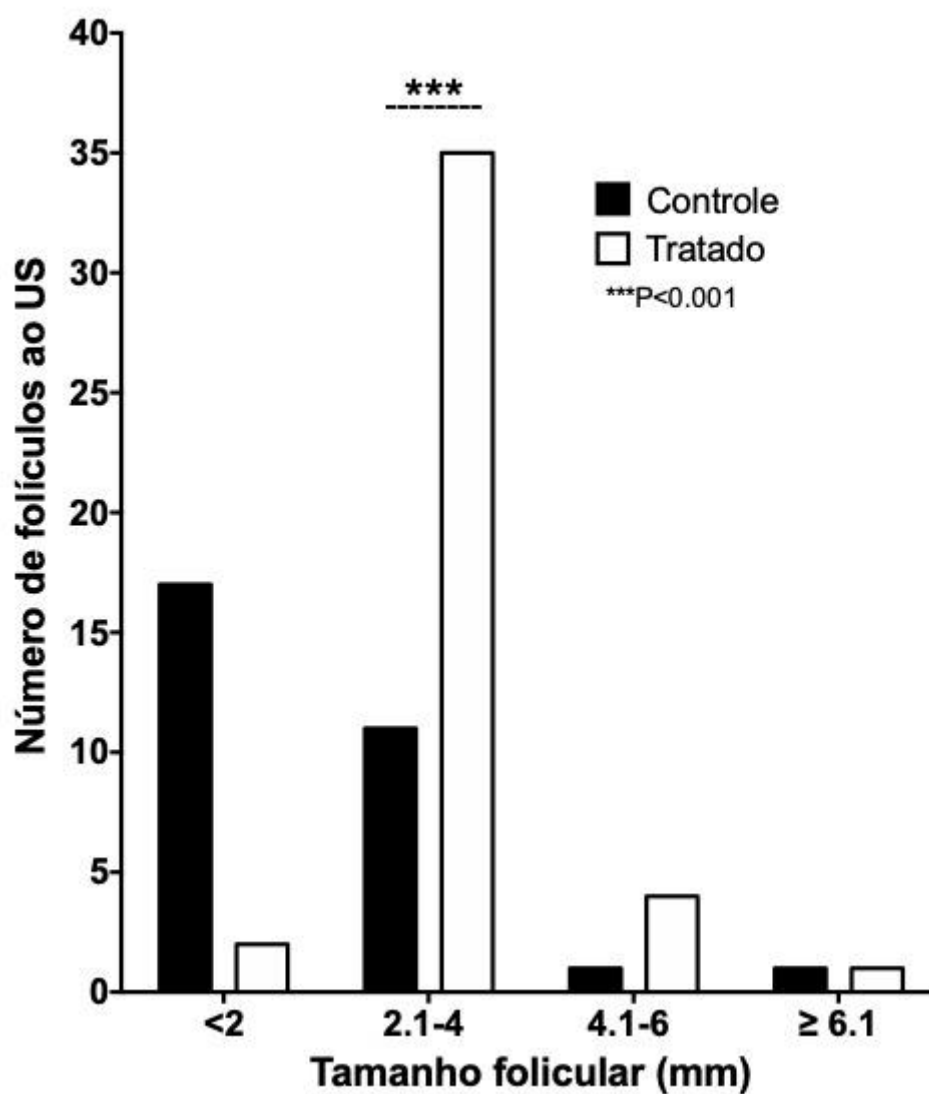


Figura 5. Gráfico referente a avaliação ultrassonográfica no D12, (primeiro dia de aplicação de pFSH).

O número de folículos no dia da cobertura apresentou diferença significativa no tamanho de 4,1 a 6 mm.

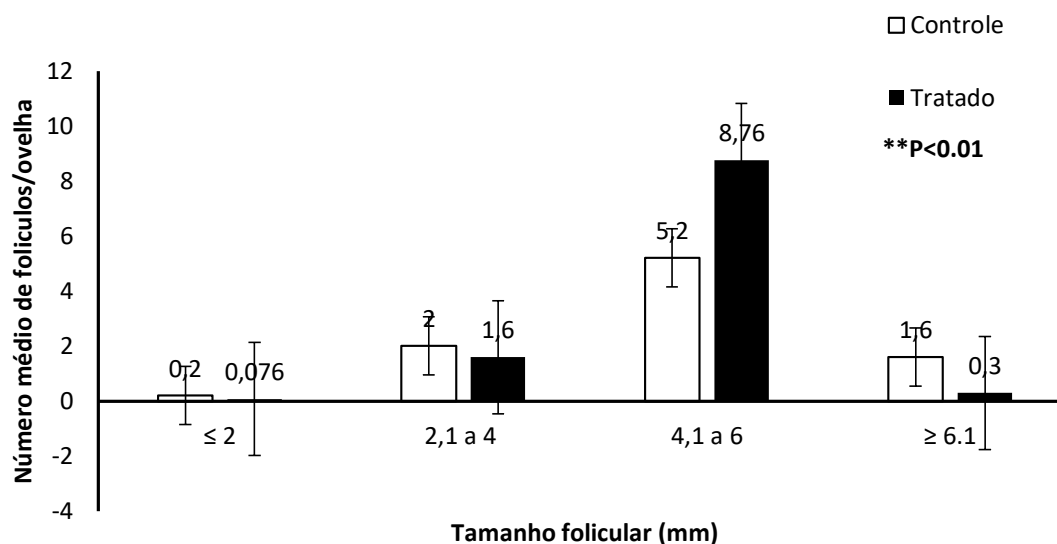


Figura 6. Gráfico referente a avaliação ultrassonográfica no D16 (dia das coberturas).

Com relação a qualidade embrionária, foi possível observar a totalidade dos embriões viáveis coletados no grupo Tratado sendo mórula, com diferença significativa no número de mórulas do grupo controle. Não houve diferença significativa no número de embriões colhidos nas outras categorias, inclusive em embriões degenerados (Fig. 7). Não foram encontradas nenhuma estrutura não fertilizada.

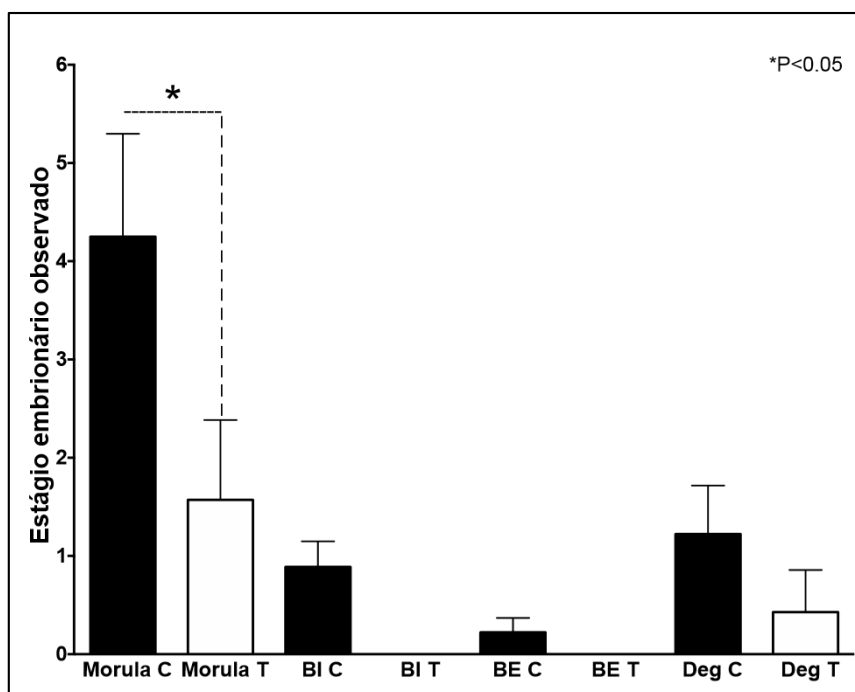


Figura 7. Número de embriões coletados em média por ovelha, dividido em grupo Tratado (T), e grupo Controle (C). BI – Blastocisto Inicial. BE – Blastocisto expandido. Deg – Embrião degenerado.

O resultado final do uso da deslorelina foi desfavorável à técnica de múltiplas ovulações e produção de embriões em ovinos, visto que ocorreu uma diminuição no número de embriões colhidos (Fig.8).

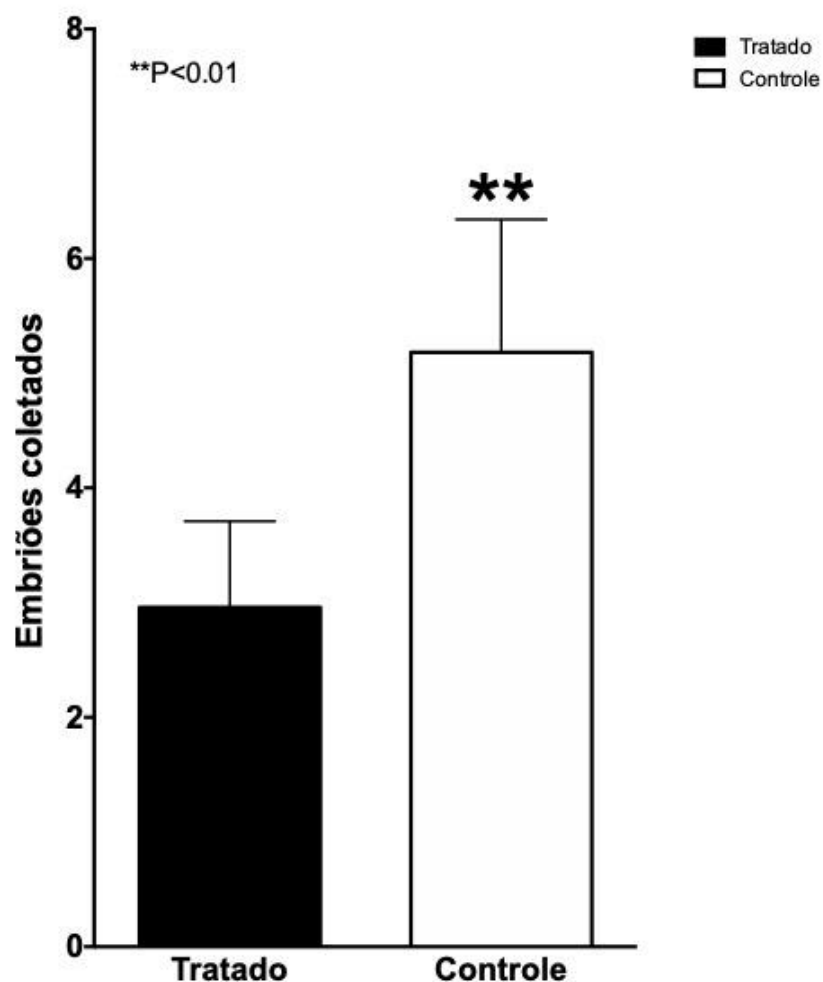


Figura 8. Número médio e erro padrão de embriões coletados por ovelha nos dois grupos Controle e Tratado.

4 Discussão

A aplicação de deslorelina dentro do tratamento de superovulação e colheita de embriões em ovinos, seguindo o protocolo descrito, resultou em maior sincronia na apresentação de cio (Fig. 2). Contudo, houve redução da quantidade de embriões colhidos, diferentemente do observado em literatura prévia, quando comparado à utilização de outros análogos de GnRH como a buserelina (Archa et al., 2006; Gharbi et al., 2012), com o qual houve aumento de 50% da taxa de embriões colhidos e também com gonadorrelina (Brasil et

al., 2016), que também obteve aumento na taxa de fertilização, sem mudança no número de ovulações, que em última análise, seria o efeito desejado.

O acetato de deslorelina possui uma ação 7 vezes mais potente que a buselerina, e o resultado sugere que a alta potência biológica encontrada na molécula da deslorelina, associada com a degradação mais lenta desse peptídeo (Pinto, 2013) interferiu no resultado final. Entretanto como demonstrado por Crowder et al. (1986), a concentração das gonadotrofinas LH e FSH na pituitária não sofre redução em animais submetidos à *down regulation*, o que refuta a possibilidade de alteração no eixo hipotálamo-hipófise, tendo em vista que o tratamento superovulatório conta com aporte exógeno de FSH.

Quando comparado ao trabalho realizado por Scagion (2015), no qual o efeito supressivo da deslorelina e o retorno a ciclicidade foi averiguado em ovelhas da raça Bergamácia, os resultados obtidos foram divergentes, pois as ovelhas do grupo Tratado no presente estudo apresentaram folículos de 2,1 a 4 mm já no terceiro dia após a última aplicação de deslorelina (Fig. 5), e no trabalho acima citado as ovelhas tratadas com deslorelina a cada 72 h apresentaram retorno ao crescimento folicular após $2,4 \pm 0,5$ dias da última aplicação, sendo observado apenas folículos pequenos segundo a descrição do autor.

Assim sendo, existem duas hipóteses de falha no protocolo utilizado no presente estudo: A primeira delas seria a regressão prematura de corpo lúteo (RPCL), e a segunda seria falha no processo ovulatório envolvendo baixas concentrações de receptores para LH nos folículos grandes e pré ovulatórios (Lopes Júnior et al., 2006; Sullivan et al. 2013; Oliveira et al., 2013).

A RPCL é predominante em ovelhas não cíclicas e quando não há pré tratamento com P4 (Liu et. al., 2007), e existem outras causas que podem gerar esse distúrbio funcional do corpo lúteo, dentre elas: Aporte inadequado de gonadotrofinas (Lamming e Mann, 1995), maturação inadequada do folículo pré ovulatório (Stubblings et al., 1986), impossibilidade do corpo lúteo responder ao LH ocasionando em falha na sua luteinização (Braden et al., 1989), e estímulo luteolítico precoce (Chemineau et al., 1993). Entretanto no presente estudo, não houve diferença significativa no número de embriões degenerados após a colheita, o que vai contra a possibilidade de RPCL, indicando uma possível falha no processo ovulatório.

Oliveira e colaboradores (2011) realizaram a suplementação de LH ao final do SOV em ovelhas santa inês e obtiveram uma tendência ($P=0.08$) a melhoria nas taxas de ovulação e frequência de corpos lúteos nos animais suplementados, corroborando dessa forma com a hipótese de falha ovulatória.

No presente estudo foi observado correlação positiva de 86,4% (Fig. 4) entre o número de corpos lúteos ao ultrassom, e o número de corpos lúteos na contagem *in situ*, durante o procedimento cirúrgico, podendo dessa forma, afirmar-se que é possível utilizar a ultrassonografia como ferramenta para definir se a doadora será ou não submetida a procedimento cirúrgico para colheita embrionária.

O tratamento crônico com GnRH pode ser dividida em duas fases, onde a primeira é caracterizada por um aumento nos níveis das gonadotrofinas, gerando crescimento folicular e ovulação, e a segunda fase onde há bloqueio nos pulsos de LH (D'occhio et al., 2000), o que explicaria os resultados obtidos na avaliação ultrassonográfica do primeiro dia ao tratamento com pFSH (D12),

a qual revelou diferença estatística no número de folículos de 2,1 a 4 mm nos dois grupos. O número de corpos lúteos obtido também foi reduzido quando comparado os dois grupos (Fig. 3), o que corrobora com uma deficiência na pulsatilidade do LH, ou redução nos receptores para LH contidos no folículo pré ovulatório, visto que na fase final de maturação oocitária, trata-se de um hormônio crucial para manutenção e crescimento de folículos grandes tanto em ovelhas (Abdennebi et al.; Campbell et al., 1999; Lopez-Alonso et al., 2005) quanto em cabras (Gonzalez-Bulnes et al., 2004; 2005).

5 Conclusão

A inclusão do acetato de deslorelina no protocolo superovulatório proposto neste experimento resultou em uma maior sincronia de apresentação de cio, contudo houve redução do número de embriões colhidos e redução no número de corpos lúteos observados no momento cirúrgico. Novos momentos para aplicação da deslorelina e doses devem ser testados a fim de averiguar possíveis falhas ovulatório ou RPCL.

6 Referências

Abdennebi, L., Monget, P., Pisselet, C., Remy, J.J., Salesse, R., Monniaux, D. 1999. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep

- 352 breeds. *Biology of Reproduction*. 60(4), 845–854.
 353 doi:10.1095/biolreprod60.4.845.
- 354 Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A. 2011. Pharmaceutical Control of
 355 Reproduction in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food*
 356 *Animal Practice*. 27(1), 67–79. DOI: 10.1016/j.cvfa.2010.10.001.
- 357 Archa, B., Chentouf, M., Bister, J.L., Boulanouar, B. 2009. Effects of two GnRH
 358 agonists pre-treatments on FSH secretion and follicular response in
 359 superovulated ewes. *Al Awamia*. 20, 3-17.
- 360 Bartlewski, P., Alexander, B., Rawlings, N., Barrett, D., & King, W. 2007.
 361 Ovarian Responses, Hormonal Profiles and Embryo Yields in Anoestrous
 362 Ewes Superovulated with Folltropin®-V after Pretreatment with
 363 Medroxyprogesterone Acetate-releasing Vaginal Sponges and a Single Dose
 364 of Oestradiol-17 β . *Reproduction in Domestic Animals*, 43(3), 299–307.
 365 doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00894.x.
- 366 Bartlewski, P.M., Sohal, J., Paravinja, V., Baby, T., Oliveira, M.E.F., Murawski,
 367 M., Keisler, D.H. 2017. Is progesterone the key regulatory factor behind
 368 ovulation rate in sheep? *Domestic Animal Endocrinology*, 58, 30–38.
 369 doi:10.1016/j.domaniend.2016.06.006.
- 370 Bartlewski, P.M., Seaton, P., Franco Oliveira, M.E., Kridli, R.T., Murawski, M.,
 371 Schwarz, T. 2016. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory
 372 yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian
 373 status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, 86(1), 130-143.
 374 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>.

- 375 Braden TD, Sawyer HR, Niswender GD. 1989. Functional and morphological
376 characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. J
377 Reprod Fertil, 86, 525-533.
- 378 Brasil, O.O., Moreira, N.H., Santos, G., Silva, B.D.M., Mariante, A.S., Ramos,
379 A.F. 2016. Superovulatory and embryo yielding in sheep using increased
380 exposure time to progesterone associated with a GnRH agonist. Small
381 Ruminant Research. 136, 54–58.
382 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.005>.
- 383 Brebion P., Cognie Y. 1989. Increased superovulation in the ewe following 14
384 days of GnRH agonist pre-treatment. Proceedings of the 5th Meeting on
385 European Embryo Transfer Association, (EETA'89), Lyon, France; p. 106-
386 106.
- 387 Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M.,
388 González-Bulnes, A. 2015. Preselection of high and low ovulatory
389 responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs.
390 Theriogenology, 84(5), 784–790. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.01
- 391 Campbell, B.K., Dobson, H., Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J. 1999. Examination
392 of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle
393 selection in sheep. J. Reprod. Fertil. 116, 355-367. DOI:
394 10.1530/jrf.0.1170355.
- 395 Chemineau P, Daveau A, Locatelli A, Maurice F. 1993. Ram-induced short
396 luteal phases-effects of hysterectomy and cellular composition of the corpus
397 luteum. Reprod Nutr Dev. 33, 253-261. PMID: 8216753.

- 398 D'occhio, M.J.; Fordyce, G.; Whyte, T.R., Aspden, W.J.; Trigg, T.E. 2000.
 399 Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproduction*
 400 Science. 60, 433–442. PMID: 10844213.
- 401 Fonseca, J.F., Souza-Fabjan, J.M.G., Oliveira, M.E.F., Leite, C.R., Nascimento-
 402 Penido, P.M.P., Brandão, F.Z., Lehloenya, K.C. 2016. Nonsurgical embryo
 403 recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 86, 144–151.
 404 doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.025.
- 405 Gharbi, I.; Ferrouk, M.; Dechicha, A.; Baril, G.; Beckers. J.F.; Guetarni, D. 2012.
 406 Follicular status and embryo production in ouled Djellal (Algeria) ewes breed
 407 pretreated with a GnRH Agonist. *Journal of Animal and Veterinary Advances*.
 408 6, 791-798. DOI: 10.3923/ajava.2012.117.127.
- 409 Gonzalez-Bulnes A., Baird D.T., Campbell, B.K., Cocero, M.J., Garcia-Garcia,
 410 R.M., Inskeep EK., López-Sebastián, A., McNeilly, A.S., Santiago-Moreno, J.,
 411 Souza, C.J., Veiga-López, A. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of
 412 multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fert Dev*.
 413 16 p.1-15. DOI: 10.10371/RD04033.
- 414 Gonzales-Bulnes A., Lopez-Sebastian A., Garcia-Garcia R.M., Veiga-Lopez A.,
 415 Souza, C.J.H., Mcneilly A.S., Restoration of endocrine and ovarian function
 416 after stopping GnRH antagonist treatment in goats. *Theriogenology*. 63, 83-
 417 91. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.019.
- 418
- 419 Lamming, G.E., Mann, G.E. 1995. Control of endometrial oxytocin receptors
 420 and prostaglandin F2 α responses to oxytocin in ovariectomized cows by
 421 progesterone and oestradiol. *J Reprod Fertil*. 103, 69-73. DOI:
 422 10.1530/jrf.0.1030069.

- 423 Liu, X., Hart, E.J., Dai, Q., Rawlings, N.C., Pierson, R.A., Bartlewski, P.M. 2007.
424 Ultrasonographic image attributes of nonovulatory follicles and follicles with
425 different luteal outcomes in gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- treated
426 anestrous ewes. *Theriogenology*. 67, 957-969. DOI:
427 10.1016/j.theriogenology.2006.11.008.
- 428 Lopes Júnior, E.S., Maia, E.L.M.M., Almeida, K.C., Paula, N.R.O., Teixeira,
429 D.I.A., Rondina, D., Selaive-Villaroel, A.B., Freitas, V.J.F. 2006. Influência
430 dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e
431 produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca). *Acta*
432 *Scientiae Veterinariae*. 34, 510.
- 433 Lopez-Alonso, C., Encinas, T., Garcia-Garcia, R.M., Veiga-Lopez, A., Ros, J.M.,
434 Mcneily, A.S., Gonzalez-Bulnes A. 2005. Administration of single short-acting
435 doses of GnRH antagonist modifies pituitary and follicular function in sheep.
436 *Dom. Anim. Endocrinol.* 29, 476-487. DOI:
437 10.1016/j.domaniend.2005.02.014.
- 438 Menchaca, A., Vilariño, M., Crispo, M., Castro T., Rubianes, E. 2010. New
439 approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants.
440 *Reproduction, Fertility and Development*. 22, 113-118. DOI:
441 10.1071/RD09222.
- 442 Oliveira, M.E.F., Bartlewski, P.M., Feliciano, M.A.R. 2013. Controle do ciclo
443 estral. In: OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M; VICENTE, W.R.R. (Eds).
444 Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos, São Paulo: MedVet, p. 71-
445 89.
- 446 Rubianes, E., Ungerfeld, R., Viñoles, C., Rivero, A., Andadams, G. P. 1997.
447 Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave

448 emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 47,
449 1479–1488. DOI: 10.1016/s0093-691x(97)00155-6.

450 Souza-Fabjan, J.M.G., Rosa, R.M., Balaro, M.F.A., Pinto, P.H.N., Santos, G.B.,
451 Arashiro, E.K.N., Brandão, F. Z. 2017. Effect of different hormonal
452 combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in
453 sheep. *Theriogenology*. 103, 24–29.
454 doi:10.1016/j.theriogenology.2017.07.03.

455 Sullivan, R.R., Faris, B.R., Eborn, D., Grieger, D.M., Cino-Ozuna, A.G., Rozell,
456 T.G. 2013. Follicular expression of follicle stimulating hormone receptor
457 variants in the ewe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 113.. DOI:
458 10.1186/1477-7827-11-113.

459 Stubbings, R.B., Bosu, W.T.R., Baker, C.A., King, G.J. 1986. Serum
460 progesterone concentrations associated with superovulation and premature
461 corpus luteum failure in dairy goats. *Can J Vet Res*. 50, 369-373. PMCID:
462 PMC1255228.

463 Zohara, B.F., Azizunnesa, I.M.F., Alam, M.G.S., Bari, F.Y. 2017. Survival of
464 embryos after transfer within multiple ovulation and embryo transfer (MOET)
465 programme. *Small Ruminant Research*. 149, 11–15..
466 doi:10.1016/j.smallrumres.2016.11.002.