UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM DIFERENTES RAÇAS OVINAS NATIVAS BRASILEIRAS

Maria Amélia Ferrão Pupin

Médica veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM DIFERENTES RAÇAS OVINAS NATIVAS BRASILEIRAS

Maria Amélia Ferrão Pupin

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

P984r

Pupin, Maria Amélia Ferrão
Resposta superovulatória e produção in vivo de embriões em diferentes raças ovinas nativas brasileiras / Maria Amélia Ferrão Pupin. -- Jaboticabal, 2020
51 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira
Coorientador: Jeferson Ferreira da Fonseca

1. Medicina veterinária. 2. Reprodução animal. 3. Superovulação. 4. Produção de embriões in vivo. 5. Fluxo sanguíneo ovariano. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM DIFERENTES RAÇAS NATIVAS BRASILEIRAS

AUTORA: MARIA AMÉLIA FERRÃO PUPIN
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ANA LUCIA ROSA E SILVA MAIA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade Federal Fluminense-UFF / Niterói/RJ

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maria Amélia Ferrão Pupin, nascida em Batatais – São Paulo, aos oito dias do mês de abril do ano de mil novecentos e noventa e três. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade Doutor Francisco Maeda (FAFRAM) Ituverava – São Paulo, ano de dois mil e onze a dois mil e dezesseis. Durante o período foi monitora das disciplinas de Anatomia I, Anatomia topográfica e Patologia Geral; participou de diversos cursos de aprimoramento e congressos, sendo premiada no VI Congresso de Iniciação Cientifica na área de Medicina Veterinária com o trabalho "Achados anatomopatológicos em ovinos submetidos à dieta de alto grão". Defendeu o trabalho de conclusão de curso intitulado "Desempenho de ovinos submetidos à dieta de alto grão" sob orientação do Prof. Dr. Silvio de Paula Mello, coorientação da Prof.ª Dra. Aline Gomes de Campos e colaboração do Prof. Dr. Maico Henrique Barbosa dos Santos. Realizou treinamento técnico de fluxo contínuo com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo na Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto no projeto temático "Elaboração de uma vacina quimérica multicomponente recombinante baseada em epítopos de carrapatos *Rhipicephalus microplus*" sob orientação da Prof. Dra. Beatriz Ferreira Rossetti e da pesquisadora associada Prof. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos, com início em novembro de dois mil e dezessete até fevereiro de dois mil e dezenove. Foi aprovada na seleção de mestrado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Jaboticabal, para início do curso em março de dois mil e dezenove. Durante o período apresentou trabalhos em congressos. Ao final gerou o trabalho intitulado "Resposta superovulatória e produção in vivo de embriões em diferentes raças ovinas nativas brasileiras" sob orientação da Drª. Maria Emilia Franco Oliveira e coorientação do Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca.

AGRADECIMENTOS

Deus e a Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos recebidas até aqui e por me dar a força necessária para continuar caminhando!

A minha avó Cledis Rodrigues Pupin, por sempre me motivar, por acreditar no meu potencial, pelo amor e pelo apoio incondicional.

Aos meus pais Mônica Helena Ferrão e Jorge Alberto Pupin e aos meus avós Elcio Lair Pupin, Cipriano Dos Reis Ferrão e Maria Aparecida Da Silva pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, amigos e familiares, por compreenderem a minha ausência e pelo apoio nos momentos de alegrias e tristeza.

À minha orientadora Profª Drª. Maria Emilia Franco Oliveira por me proporcionar a oportunidade de realizar o mestrado, pelo papel fundamental neste trabalho e na minha formação. Obrigada pela dedicação, por acreditar em mim, pela oportunidade de trabalharmos juntas e por sempre me incentivar a ser uma profissional cada dia melhor. Muito obrigada por toda contribuição.

Ao meu coorientador Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca pelo papel fundamental neste trabalho. Obrigada pela dedicação e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Aos pesquisadores e funcionários da Embrapa Caprinos e Ovinos Sobral/CE, pela ajuda, apoio, dedicação e colaboração para que pudesse desenvolver o estudo.

Aos colegas de mestrado Gabriel Brun Vergani e Monalisa Sousa Dias Lima por toda a colaboração no desenvolvimento deste estudo, vocês foram essenciais. Muito obrigada!

Aos Professores e servidores técnicos do Departamento de Reprodução animal pela contribuição e atenção. Especialmente ao Sr. Edson e o Hugo.

As amigas pós-graduandas Naiara Nantes Rodrigues, Rafaela Faresin Pastorio e Giovana Barros Nunes, por toda convivência prazerosa e divertida. Obrigada pela bela amizade construída neste tempo, vocês tornaram a jornada mais tranquila e alegre!

As minhas grandes amigas Sabrina Nathalia Louzada Nogueira, Aline Gomes Campos Nascimento, Rafaela Oliveira Souza e Isabela Pazotti Daher, não só pelo

convívio, mas por toda ajuda cumplicidade e principalmente pelas horas de conversa, obrigada por tudo!

A UNESP por tudo que me proporcionaram.

A Capes pela bolsa de estudo concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma estiveram envolvidos neste projeto, auxiliando e tornando possível a concretização deste trabalho!

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE FIGURAS vii

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais 1
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) 3
2.2 Efeito raça 4
2.2 Ultrassonografia na reprodução de pequenos ruminantes 6
REFERÊNCIAS 7

CAPÍTULO 2 – Superovulatory response and *in vivo* production of embryos in different native Brazilian sheep breeds 10
1. Introduction 11
2. Material and Methods 12
2.1 *Location, ethics and experimental animals* 12
2.2 *Superovulation protocol and mating* 13
2.3 *Ultrasound assessment* 14
2.4 *Non-surgical embryo recovery* 14
2.5 *Analyses of ultrasound images* 14
2.6 *End points and statistical analysis* 15
3. Results 16
4. Discussion 19
5. Conclusion 22
References 22

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Embrapa Gado de Leite

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo de pontos estratégicos para a elevação da eficiência da superovulação, colheita, criopreservação e transferência de embriões em ovinos", protocolado sob o CEUA nº 2512100516, sob a responsabilidade de **Jeferson Ferreira da Fonseca** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) na reunião de 30/06/2016.

We certify that the proposal "Study of strategic points for increasing efficiency of superovulation, embryo recovery, cryopreservation and transfer in sheep", utilizing 30 Ovines (30 females), protocol number CEUA 2512100516, under the responsibility of **Jeferson Ferreira da Fonseca** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Embrapa Gado de Leite Corporate (CEUA/EGL) in the meeting of 06/30/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2016 a 03/2020 Área: Núcleo Produção E Bem Estar Animal

Procedência:	Campo Experimental José Henrique Bruschi				
Espécie:	Ovinos	sexo: Fêmeas	idade: 02 a 06 anos	N:	30
Linhagem:	Santa Inês		Peso: 30 a 50 kg		

Resumo: Este projeto reflete a ação de um grupo de pesquisadores dedicados ao estudo dos fenômenos relacionados ao controle e manipulação da reprodução em caprinos e ovinos e à transferência de tecnologias associadas. Representa uma sequência de estudos finalizados ou em execução que tem abordado a superovulação, colheita, criopreservação e transferência de embriões em pequenos ruminantes apoiados por FAPESP, FAPERJ, FAPEMIG e Embrapa. Estima-se que 100% dos embriões ovinos produzidos in vivo no mundo sejam recuperados por procedimentos cirúrgicos. Tais procedimentos incorrem em riscos a vida do animal (anestesia e cirurgia), jejum prolongado, sequelas cirúrgicas (aderências), entre outros fatores que limitam a expansão de uso repetido de doadoras. Já há proibição em alguns países com relação a este método e, a exemplo do que ocorreu com bovinos, estima-se que os procedimentos não cirúrgicos substituam cada vez mais os cirúrgicos. Esta sequência de projetos citados propõe uma mudança para recuperação não cirúrgica de embriões. Uma vez identificada a dinâmica folicular associada a protocolos de superovulação na raça Santa Inês (FAPESP - 2008/05503-2), um novo desafio é o estudo de diferentes doses superovulatórias. Isto agora será possível por meio de procedimentos não cirúrgicos (ultrassonografia em modo Doppler e Colheita não cirúrgica de embriões). Diante da definição da melhor dose superovulatória, o desafio seguinte é a investigação do método e protocolo de acasalamento mais viável para fêmeas doadoras de embriões. Os resultados do projeto 03.12.01.031.00.02 tornaram viável a recuperação transcervical de embriões na raça santa Inês. Seguindo-se as recomendações baseadas nos resultados deste projeto, pode-se chegar a até 80% de sucesso de lavado não cirúrgico, fazendo que em apenas 20% dos animais fosse necessária a coleta cirúrgica. Ao final deste projeto, um piloto com quatro ovelhas da raça Morada Nova obteve 100% de sucesso de lavado uterino pela via transcervical. Esta possibilidade foi apontada como uma das consequências ou perspectivas do projeto. No novo formato proposto, além melhora do protocolo de relaxamento cervical em ovelhas Santa Inês, pretende-se estender abrangência para as raças Somalis, Morada Nova, Pantaneira e Lacaune. Face à expectativa de quantidade considerável de embriões a ser produzida, criou-se a possibilidade de trabalhar com protocolos de criopreservação. Como última escala de trabalho proposta, embriões criopreservados ou não poderiam ser transferidos para receptoras. Assim, o estudo de características das receptoras que podem interferir na taxa de gestação destes embriões é também necessário. Um piloto apontou para a possibilidade de incrementar o número de corpos lúteos e a progesterona plasmática de ovelhas nulíparas. Este novo projeto propõe a amplificação deste estudo. Os resultados darão suporte de conhecimento a respeito da eficiência e viabilidade da técnica de coleta embrionária não-cirúrgica transcervical em ovelhas de várias raças de interesse nacional. Conjuntamente, os resultados podem consolidar o Brasil como a maior referência mundial sobre produção in vivo de embriões ovinos recuperados por via não cirúrgica, abrindo perspectivas para aplicação em outras raças ovinas que não aquelas abordadas na proposta.

Local do experimento: Setor de Caprinos e Ovinos - Campo Experimental José Henrique Bruschi

Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36038-330 - Sede da Embrapa Gado de Leite - tel: 55 (32) 3311-7496 / fax: 55 (32) 3311-7401
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8:00h às 12:00h : e-mail: cnpgl.ceua@embrapa.br

Embrapa Gado de Leite

Comissão de Ética no Uso de Animais

Juiz de Fora, 19 de julho de 2016

Dra. Clara Slade Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Gado de Leite

Dra. Bruna Rios Coelho Alves
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36038-330 - Sede da Embrapa Gado de Leite - tel: 55 (32) 3311-7496 / fax: 55 (32) 3311-7401
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8:00h às 12:00h : e-mail: cnpgl.ceua@embrapa.br
CEUA N 2512100516

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO IN VIVO DE EMBRIÕES EM DIFERENTES RAÇAS OVINAS NATIVAS BRASILEIRAS

RESUMO – Com finalidade de aumentar o rebanho e a variabilidade genética, produtores de ovinos, estão optando pela biotécnica de múltipla ovulação e transferência de embriões. Porém, está técnica apresenta resultados imprevisíveis, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, dos quais destaca-se o efeito raça. Portanto, esse estudo avaliou o efeito raça sobre a resposta superovulatória e a produção *in vivo* de embriões em ovelhas nativas brasileiras (Morada Nova, Santa Inês e Somalis Brasileira). Trinta ovelhas multíparas (*n* = 10/ raça) foram submetidas a protocolo de nove dias de duração à base de progesterona e tratamento superovulatório com 133 mg de FSH. Nos Dias 11 (36 horas após a remoção do dispositivo) e 15 (12 horas antes da colheita não cirúrgica de embriões), os animais foram submetidos às análises ultrassonográficas em modo-B e Doppler para avaliação da população ovariana e características de perfusão ovariana. A colheita transcervical dos embriões foi realizada 7 dias após a remoção do dispositivo. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA, teste de Tukey e teste de Bartlett; e as correlações foram testadas pelo teste de Spearman ($p < 0,05$). O número de folículos médios (4,0 a 5,99 mm) no Dia 11 foi maior ($p = 0,0025$) em ovelhas Santa Inês e Somalis Brasileira comparadas às ovelhas Morada Nova. O número de corpos lúteos e o status Superovulatório no Dia 15 foram maiores ($p < 0,0001$) para ovelhas Santa Inês (15,3 ± 1,4 e 2,4 ± 0,2), seguido pelas ovelhas Somalis Brasileira (10,4 ± 0,8 e 1,5 ± 0,2) e então pelas ovelhas Morada Nova (5,5 ± 1,6 e 0,8 ± 0,3). A área ovariana ($p = 0,02$), área de fluxo sanguíneo ($p= 0,05$) e porcentagem da área doplller ($p = 0,007$) tiveram maiores valores no Dia 15 em relação ao Dia 11 para as ovelhas Santa Inês e Somalis Brasileira. Para as características de fluxo sanguíneo de alta velocidade foram encontrados maiores valores no Dia 15 em relação ao Dia 11, independentemente da raça. Para cada raça foram registradas distintas correlações entre características ovarianas e resposta superovulatória e produção de embriões. Em conclusão, houve influência da raça sobre as respostas superovulatórias e características da vascularização ovariana. No entanto, a produção de embriões foi similar entre as raças de ovelhas nativas brasileiras.

Palavras-chave: População ovariana, Doppler colorido, Perfusão sanguínea ovariana, Superovulação.

SUPEROVULATORY RESPONSE AND *IN VIVO* PRODUCTION OF EMBRYOS IN DIFFERENT NATIVE BRAZILIAN SHEEP BREEDS

ABSTRACT - In order to increase the herd and genetic variability, sheep producers are opting for multiple ovulation and embryo transfer. This technique, however, provides unpredictable results due to intrinsic and extrinsic factors. Among these factors the breed effect stands out. The present study assessed if the breed effect influences the follicular population, ovarian blood perfusion, superovulatory response, and the *in vivo* production of embryos in native Brazilian sheep breeds (Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira). Thirty multiparous ewes (n=10/breed) received intravaginal devices impregnated with 0.33 g of progesterone for nine days and superovulatory treatment with 133 mg of FSH started 60 h before the device removal. On Days 11 (36h after device removal) and 15 (12h before non-surgical embryo recovery, NSER) the ewes were submitted to B-mode and Doppler ultrasonography to evaluate the ovarian population and characteristics of ovarian blood perfusion. NSER was performed seven days after device removal. The number of medium follicles (4.0 to 5.99 mm) on Day 11 was greater (p=.0025) in Santa Inês and Somalis Brasileira compared to Morada Nova ewes. The number of corpora lutea and superovulatory status on Day 15 was greater (p<0.0001) for Santa Inês (15.3±1.4 and 2.4±0.2), followed by Somalis Brasileira (10.4±0.8 and 1.5±0.2) and then Morada Nova ewes (5.5±1.6 and 0.8±0.3). The ovarian area (DA, p=.02), blood flow area (TA, p=.05), and DA/TAx100% (p=.007) had greater values on Day 15 in relation to Day 11 for the Santa Inês and Somalis Brasileira ewes. The high-velocity blood flow characteristics had greater values on Day 15 in relation to Day 11, regardless of breed. For each breed, different correlations were recorded between ovarian blood flow characteristics and superovulatory response and embryo yield. In conclusion, there was an influence of the breed effect on the number of medium follicles, superovulatory responses and for characteristics of ovarian blood perfusion; however, the *in vivo* embryo production was similar among native Brazilian sheep breeds.

Keywords: Ovarian population, Color Doppler, Ovarian blood perfusion, Superovulation.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. População de folículos antrais ovarianos (média ± SEM) no tempo 36 h após a remoção do dispositivo de progesterona de ovelhas nativas brasileiras (Morada Nova, Santa Inês e Somalis Brasileira) tratadas com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes..... **29**

Tabela 2. Respostas superovulatórias e de produção *in vivo* de embriões (média ± SEM) de ovelhas nativas brasileiras (Morada Nova, Santa Inês, Somalis Brasileira) tratadas com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes..... **30**

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Representação esquemática dos procedimentos experimentais usados para avaliar o efeito da raça em ovelhas nativas brasileiras (Morada Nova, Santa Inês e Somalis Brasileira) tratadas com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes..... **31**

Figura 2. Interação entre o efeito raça e os dias de avaliação ultrassonográfica (Dia 11 e Dia 15) das características de vascularização ovariana (média ± SEM) de ovelhas nativas brasileiras (Morada Nova, Santa Inês e Somalis Brasileira) tratadas com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes..... **32**

Figura 3. Imagem Doppler colorido mostrando a presença de sinais positivos de intensidade de fluxo sanguíneo e medida da área de fluxo sanguíneo de ovelhas Santa Inês nativas do Brasil submetidas a um protocolo de sincronização de estro à base de progesterona de 9 dias associado a 133 mg de pFSH administrado em seis doses decrescentes iniciadas 60 horas antes da remoção do dispositivo..... **33**

Figura 4. Exemplo de imagem de Doppler colorido mostrando a presença de sinais positivos de intensidade de fluxo sanguíneo e medida da área de fluxo sanguíneo em alta velocidade (0,055–0,11 m / s; denotada por retângulos verdes) de ovelhas Santa Inês nativas brasileiras submetidas a um 9 protocolo de sincronização de estro baseado em progesterona de um dia associado a 133 mg de pFSH administrado em seis doses decrescentes iniciadas 60 horas antes da remoção do dispositivo..... **34**

Figura 5. Características da perfusão sanguínea ovariana (média ± SEM) segundo raça e dias de avaliação de ovelhas brasileiras nativas (Morada Nova, Santa Inês e Somalis Brasileira) submetidas a um protocolo de sincronização de estro à base de progesterona de 9 dias associado a 133 mg de pFSH administrado em seis doses decrescentes iniciadas 60 horas antes da remoção do dispositivo..... **35**

Figura 6. *Heatmap* da correlação entre as variáveis de vascularização ovariana (Dia 11 e Dia 15), resposta superovulatória e produção de embriões dos animais Morada Nova tratados com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes. Cores frias (azul) indicam uma correlação positiva, cores quentes (vermelho) indicam uma correlação negativa, cores brancas indicam que não possui correlação e os x indicam que não houve correlação significativa ($p < 0,05$)..... **36**

Figura 7 *Heatmap* da correlação entre as variáveis de vascularização ovariana (Dia 11 e Dia 15), resposta superovulatória e produção de embriões dos animais Santa Inês tratados com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes. Cores frias (azul) indicam uma correlação positiva, cores quentes (vermelho) indicam uma correlação negativa, cores brancas indicam que não possui correlação e os x indicam que não houve correlação significativa ($p < 0,05$)..... **37**

Figura 8. *Heatmap* da correlação entre as variáveis de vascularização ovariana (Dia 11 e Dia 15), resposta superovulatória e produção de embriões dos animais Somalis Brasileira tratados com protocolo base de sincronização de estro com progesterona por nove dias associado a 133 mg de pFSH em seis injeções decrescentes. Cores frias (azul) indicam uma correlação positiva, cores quentes (vermelho) indicam uma correlação negativa, cores brancas indicam que não possui correlação e o x indica que não houve correlação significativa ($p \leq 0,05$)..... **38**

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) têm sido investigada a fim de melhorar sua eficiência e acelerar a multiplicação de rebanhos e programas de melhoramento genético (MACIEL et al., 2017). A expansão da popularização desta biotécnica em ovinos é limitada (BARTLEWSKI, 2019a). Devido à imprevisibilidade de suas respostas que está relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos (BARTLEWSKI et al., 2016), os quais de forma isolada ou em associação podem levar ao sucesso ou fracasso total mesmo quando se usa protocolos idênticos (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). Dentre os fatores intrínsecos que podem influenciar a resposta superovulatória e produção de embriões viáveis destacam-se raça, idade, população folicular presente ao início do tratamento superovulatório, fluxo sanguíneo ovariano e alterações genômica (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004). Embora o fator raça seja sempre listado, há ainda muito a ser elucidado.

Estudos revelaram diferenças entre raças para o número de corpos lúteos, número de estruturas recuperadas e número de embriões viáveis produzidos em programas de MOTE. (AMMOUN et al., 2006; BRASIL et al., 2018; REBOLLEDO et al., 2017). Em um estudo conduzido por Rebolledo et al, (2017), foi observado que ovelhas da raça Dorper apresentaram resposta superovulatória superiores quando submetidas ao protocolo de MOTE, quando comparadas com ovelhas das raças Katahdin, Blackbelly e Pelibuey. O mesmo foi relatado em um estudo conduzido por Ammoun et al. (2006), para ovelhas da raça Rubia del Molar em relação a ovelhas Manchega e Negra de Colmenar.. Entretanto, vale ressaltar que entre as raças de ovelhas nativas brasileiras, as melhores respostas superovulatórias foram observadas para a ovelhas da raça Morada Novas em comparação a ovelha Somalis (BRASIL et al., 2018). Entretanto, com base nesses estudos faz-se necessário avaliar a população ovariana ao longo do protocolo e ver as alterações causadas nessa população sob influência da superestimulação.

Com base no acima descrito, os estudos sugerem que as diferenças entre raças possam ser explicadas por diferenças na dinâmica ovariana ao longo dos

protocolos de sincronização base para superovulação, e em virtude de respostas distintas frente às gonadotrofinas exógenas. A definição de protocolos adequados à peculiaridade de cada raça potencialmente reduzirá ou evitará a variabilidade das respostas à superovulação e produção embrionária *in vivo* e, assim, maior sucesso e aplicabilidade da biotécnica serão alcançados (BRASIL et al., 2018).

Outro fator que pode ter relação com a resposta superovulatória e a produção de embriões é a perfusão ovariana. A ultrassonografia modo Doppler colorido vem sendo utilizada para prever as respostas superovulatórias em ovinos, porém a aplicabilidade progride lentamente (BARTLEWSKI, 2019b). A técnica pode ser utilizada para enumerar estruturas lúteas no dia da recuperação dos embriões, e embora as alterações hemodinâmicas estejam relacionadas à funcionalidade dos corpos lúteos, não foram identificadas diferenças visuais da vascularização entre corpos lúteos normais e os de regressão prematura (OLIVEIRA et al., 2018).

Além disso, estudos de fluxo sanguíneo de folículos antrais em ovelhas superovuladas apontaram que o sinal Doppler colorido de alta velocidade da parede folicular no segundo dia do tratamento superovulatório pode indicar a eficiência de resposta superovulatória e produção de embriões (OLIVEIRA et al., 2017) e o sinal Doppler colorido no quarto dia do tratamento superovulatório tem correlação negativa com o número de oócitos não fertilizados. (OLIVEIRA et al., 2014) Com base nessas informações, nota-se serem substanciais mais estudos sobre a aplicabilidade da técnica Doppler nas avaliações da resposta superovulatória em pequenos ruminantes, principalmente se há divergência entre as raças.

Dessa forma, diante do exposto acima, o presente estudo foi delineado para avaliar se a raça influencia a população folicular, vascularização ovariana, resposta superovulatória e a produção *in vivo* de embriões em ovelhas de raças nativas brasileiras (Morada Nova, Santa Inês e Somalis Brasileira). Adicionalmente, foram investigadas correlações entre a perfusão ovariana, resposta superovulatória e a produção *in vivo* de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE)

O programa de MOTE tem impacto evidente no melhoramento de bancos genéticos, zootécnicos e sanitários, além de apoiar a outras biotécnicas em pequenos ruminantes (FONSECA et al., 2014). Dentre os benefícios que esta biotécnica proporciona, o principal é aumentar o número de embriões produzidos com maior qualidade, através de técnicas que possibilitam a produção de altos números de folículos, ovulações e embriões (OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto, a utilização da MOTE ainda não apresenta difusão ampla na espécie ovina devido as suas limitações, como a disponibilidade limitada de dados de linhagem e desempenho; dificuldade em ultrapassar a cérvix da ovelha e a falta de protocolos superovulatórios padronizados (CANDAPPA; BARTLEWSKI, 2011).

Os protocolos de superovulação são essenciais para MOTE alcançar resultados satisfatórios, porém, estudos vêm sendo realizados para encontrar formulações que possam ser rentáveis e com resultados homogêneos (MACIEL et al., 2017). (Alterações na duração dos protocolos base com progesterona), mostraram respostas distintas, sendo que os protocolos de curto duração (6,5 dias) obtiveram um aumento nas respostas superovulatórias em comparação aos de longo duração (14,5 dias) (OLIVEIRA et al., 2020). Por conseguinte, ao avaliar o efeito da duração do protocolo de 6 ou 9 dias, relatou-se um aumento no número de folículos entre 4,1 - 5,0 mm, o qual, promoveu um maior número de ovulações e produção de embriões no protocolo de 9 dias quando comparado ao de 6 dias (FIGUEIRA et al., 2020). Outro fator que pode influenciar a resposta superovulatória é a população folicular ovariana presente no momento da primeira dose de FSH, visto que quando há presença de folículos pequenos (~3 mm) a resposta superovulatória é alta (AMMOUN et al., 2006). Além disso, esta população pode influenciar a variabilidade da resposta superovulatória entre indivíduos da mesma raça (REBOLLEDO et al., 2017).

Modificações em protocolos de estimulação ovariana e avaliações do status gonadal demostram que fatores intrínsecos e extrínsecos, integrados ou não,

dificultam a padronização de um protocolo superovulatório que proporcione resultados eficientes, sugerindo que há necessidade de expandir o foco para fatores que possam reduzir a falta de consistência nos rendimentos superovulatórios (BARTLEWSKI et al., 2016). Essa variabilidade nos resultados das respostas superovulatórias é o maior desafio dos programas de MOTE (PINTO et al., 2020). Dentre os fatores intrínsecos, a raça mostra-se como um fator pertinente de variação (TORRÈS; COGNIÉ; COLAS, 1987).

2.2 Efeito raça

O fator raça mostra relevância na variabilidade das respostas superovulatórias e na necessidade de adequar os protocolos superovulatórios para cada raça ovina (AMMOUN et al., 2006; BRASIL et al., 2018; GONZALEZ-AÑOVER et al., 2007; REBOLLEDO et al., 2017; SWELUM; AL-OWAIMER; ABOUHEIF, 2014). Frente a um protocolo base com progesterona por 14 dias, com troca de esponja no dia 9, e administração de 88 mg do hormônio folículo estimulante ovino (oFSH), ovelhas de raças espanholas (Manchega, Negra de Colmenar e Rubia del Molar) demostraram respostas distintas no número de folículos pré-ovulatórios (≥4 mm), número de corpos lúteos e número de embriões viáveis, sendo os animais da raça Rubia del Molar os que apresentaram melhor resposta (AMMOUN et al., 2006). Ovelhas de raças da Península Arábica apresentaram diferentes respostas frente ao mesmo protocolo em relação ao número de corpos lúteos e número de embriões recuperados, no qual as ovelhas Naeimi apresentaram resultados superiores quando comparadas a ovelhas Najdi (SWELUM; AL-OWAIMER; ABOUHEIF, 2014).

Já ovelhas de raças brasileiras, Morada Nova e Somalis Brasileira, também apresentaram diferenças nas respostas superovulatórias, como número de corpos lúteos, número de estruturas recuperadas e número total de embriões, frente ao protocolo de 14 dias com a realização de inseminação artificial e subsequente a coleta cirúrgica de embriões (BRASIL et al., 2018). Essas respostas distintas na superovulação podem estar relacionadas às diferenças nas taxas de prolificidade de cada raça ovina (CAHILL; DUFOUR, 1979). As taxas de prolificidade das ovelhas nativas brasileiras diferem, sendo as ovelhas Morada Nova as que possuem maior

taxa (1,51) quando comparadas as ovelhas da raça Somalis Brasileira (1,04).; Os animais Morada Nova possuem descendência de raças primitivas de arietinos, que foram submetidas à seleção natural na região nordeste do Brasil, prevalecendo apenas os animais desprovidos de lã (GONÇALVES et al., 2012).; Já a raça Somalis Brasileira, também conhecida como ovino de “garupa gorda” tem origem no “corno da África”, região formada pela Somália e Etiópia. Por sua vez, a raça Santa Inês, tem a taxa de prolificidade de 1,23 e sua origem é o resultado de cruzamentos intercorrentes produzidos no nordeste brasileiro, suas características atuais são provenientes da seleção natural (MORAIS; MADALENA, 2006).

Porém, é importante ressaltar que diferenças nas respostas superovulatórias também foram descritas em animais com baixa taxa de prolificidade quando comparados com animais de alta prolificidade (Rebolledo et al., 2017). Em detalhes, Rebolledo et al. (2017) revelaram que o efeito raça influenciou a resposta superovulatória das ovelhas, sendo a de melhor desempenho as ovelhas Dorper, que apresentam baixa taxa de prolificidade quando comparadas as raças Katahdin, Blackbelly e Pelibuey. Essas divergências nas respostas superovulatórias perante o efeito da raça podem estar relacionadas às diferenças na dinâmica ovariana ao longo dos protocolos de sincronização base para superovulação e em virtude de respostas distintas frente às gonadotrofinas exógenas (AMMOUN et al., 2006; BRASIL et al., 2018; REBOLLEDO et al., 2017). Estas diferenças, por sua vez, podem estar relacionadas às variações de sensibilidade dos receptores ovarianos (DUFOUR et al., 2000).

A variação da sensibilidade pode ocorrer por alterações genéticas, que estão relacionadas ao mecanismo de múltipla ovulação fisiológica. Esse mecanismo ocorre quando os folículos antrais são menores (~50% do tamanho) na fase de recrutamento, e se desenvolvem de forma lenta; ao atingir a dominância, os folículos antrais de tamanho reduzido não possuem a concentração de estrógeno suficiente para bloquear o FSH, com isso, o folículo seguinte pode adquirir dominância, seguindo uma ordem hierárquica, até que o número de folículos e respectivamente as concentrações de estrógeno sejam suficientes para suprimir o FSH (GARCIA-GUERRA et al., 2018). Portanto, ao adequar protocolos superovulatórios específicos para cada raça, será possível promover uma redução na variabilidade

das respostas superovulatórias e produção embrionária, alcançando avanços na aplicabilidade da técnica (BRASIL et al., 2018).

2.3 Ultrassonografia na reprodução de pequenos ruminantes.

A fim de obter resultados satisfatórios nos programas de MOTE, as utilizações de combinações de técnicas como ultrassonografia modo B e Doppler colorido, com dosagens hormonais e estudos histológicos do trato reprodutor, possibilitaram a evolução dos estudos da fisiologia dos animais e proporcionaram a avaliação de diferenças no status reprodutivo ou quando utilizados tratamentos hormonais (BARTLEWSKI, 2019a).

A ultrassonografia é a técnica não invasiva que permite a visualização em tempo real dos órgãos e tecidos internos, sendo a técnica mais usada para diagnósticos e pesquisa em animais (BARTLEWSKI, 2019b). O modo Doppler colorido vem sendo utilizado para avaliação dos parâmetros relacionados ao fluxo sanguíneo (FELICIANO et al., 2013). Ao combinar o modo Doppler com a ultrassonografia modo B, e os avanços nos equipamentos e tecnologias da imagem, este poderá ser o método diagnóstico não invasivo mais utilizado na reprodução de pequenos ruminantes (BARTLEWSKI, 2019b). Em ovinos, os estudos ainda são escassos, mas indicam que a utilização da ultrassonografia modo Doppler pode ser uma ferramenta para prever os resultados da resposta a MOTE (OLIVEIRA et al., 2014, 2017; PINTO et al., 2018). E seguindo a hipótese que a ultrassonografia Doppler colorido poderia substituir a avaliação laparoscopia na contagem de corpos lúteos em ovinos superovulados, Pinto et al. (2018) demostraram que a técnica Doppler colorido é eficaz e pode substituir a laparoscopia, no entanto, a precisão da contagem diminui quando há mais de quatro corpos lúteos presentes. Desse modo, a aplicabilidade no campo da pesquisa de pequenos ruminantes progride lentamente em comparação com as ultrassonografias em escala de cinza em tempo real e análise de imagem computadorizadas (BARTLEWSKI, 2019b).

REFERÊNCIAS

AMMOUN, I. et al. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 896–905, 2006.

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

BARI, F. et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 147–155, 2001.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 130–143, 2016.

BARTLEWSKI, P. M. Recent advances in superovulation in sheep. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. June, p. 126–128, 2019a.

BARTLEWSKI, P. M. Applications of Doppler ultrasonography in reproductive health and physiology of small ruminants. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. June, p. 122–125, 2019b.

BRASIL, O. . et al. Produção de embriões em ovinos Morada Nova e Somalis Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1390–1394, 2018

CAHILL, L. P.; DUFOUR, J. Follicular populations in the ewe under different gonadotrophin levels. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 19, n. 5, p. 1475–1481, 1979.

CANDAPPA, I.; BARTLEWSKI, P. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 3, p. 162–175, 2011.

CÉLIA, L. et al. EFFECT OF FLUNIXIN MEGLUMINE AND hCG AT COMMERCIAL PROGRAMS FOR MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER (MOET) IN SHEEP. **Archieves of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 63–69, 2012.

FONSECA, J. F. et al. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 1, p. 118–125, 2019.

DÍAZ, P. U. et al. Hemodynamic changes detected by Doppler ultrasonography in the ovaries of cattle during early development of cystic ovarian disease. **Animal Reproduction Science**, v. 209, n. February, p. 106164, 2019.

DUFOUR, J. J. et al. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 85–94, 2000.

FIGUEIRA, L. M. et al. **Preovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and non-surgical embryo recovery**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 145

FONSECA, J. F. DA et al. **Biotecnologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite**

Embrapa Caprinos e Ovinos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [s.l: s.n.].

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–283, 2000.

GARCIA-GUERRA, A. et al. Mechanisms regulating follicle selection in ruminants: Lessons learned from multiple ovulation models. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Irrs, p. 660–679, 2018.

GONÇALVES, J. . et al. Desempenho reprodutivo de ovelhas das raças Morada Nova e Somalis Brasileira criadas na região Nordeste do Brasil. **VII Congresso Nordestino de Produção Animal**, p. 2–4, 2012.

GONZALEZ-AÑOVER, P. et al. Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 29–33, 2007.

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 421–435, 2004.

HANRAHAN, J. P. et al. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (Ovis aries)1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 900–909, 2004.

MACIEL, G. S. et al. Ovarian Superstimulation Treatment for Multiple Ovulation and Embryo Transfer Programs in Sheep. **Investigação**, v. 16, n. 8, p. 30–36, 2017.

MOORE, R. K.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 356–361, 2004.

MORAIS, O. .; MADALENA, F. . Economic Values for Production Traits in Santa Inês Sheep. p. 6–9, 2006.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5104–5109, 2001.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 1–2, p. 30–37, 2014

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Relationship of antral follicular blood flow velocity to superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 182, n. November 2016, p. 48–55, 2017

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 742–750, 2018.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Repeated trans-cervical embryo recoveries in Santa inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. **Animal Reproduction**

Science, v. 217, n. April, p. 106469, 2020.

PINTO, P. H. N. et al. Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 266–269, 2018.

PINTO, P. H. N. et al. Successive in vivo embryo production in Santa Inês sheep. **Animal Production Science**, v. 60, n. 4, p. 497–502, 2020.

RAJAB, M. H. et al. Performance of three tropical hair sheep breeds. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3351–3359, 1992.

REBOLLEDO, Á. D. et al. Follicular population at the onset of a superovulatory treatment and ovarian response in hair ewes. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 22, n. 2, p. 12427–12431, 2017.

SILVA, B. D. M. et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 89–92, 2011.

SOUZA, C. J. H. et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. **Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 2, p. 3–8, 2001.

SWELUM, A. A. A.; AL-OWAIMER, A. N.; ABOUHEIF, M. A. Effects of breed and number of embryos transferred on the efficacy of MOET in sheep. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 13, n. 2, p. 98–103, 2014.

TORRÈS, S.; COGNIÉ, Y.; COLAS, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. **Theriogenology**, v. 27, n. 2, p. 407–419, 1987.

CAPÍTULO 2 –Superovulatory response and *in vivo* production of embryos in different native Brazilian sheep breeds

Maria Amélia Ferrão Pupin[a], Maria Emilia Franco Oliveira[a,b,*], Gabriel Brun Vergani[a], Monalisa Sousa Dias Lima[c], Kleibe Moraes[b], Alexandre Weick Uchôa[a], Alexandre Floriani Ramos[d], Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista[e], Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan[f], Pawel Mieczyslaw Bartlewski[g], Jeferson Ferreira da Fonseca[b]

[a] Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil

[b] Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brazil

[c] Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

[d] Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

[e] Universidade Federal do Vales dos Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, MG, Brazil

[f] Universidade Federal Fluminense Niterói, RJ, Brazil

[g] Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, ON, N1G 2W1 Canada

*Correspondence: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, S/N - Vila Industrial, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

Email: mef.oliveira@unesp.br

ABSTRACT

The present study assessed if the breed influences the follicular population, ovarian blood perfusion, superovulatory response and the *in vivo* embryo production in native Brazilian ewes (Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira). Thirty multiparous ewes (n=10/breed) received intravaginal devices impregnated with 0.33 g of progesterone for nine days and superovulatory treatment with 133 mg of pFSH. On Days 11 (36 h after device removal) and 15 (12 h before non-surgical embryo recovery, NSER) ewes were submitted to B-mode and Doppler ultrasonography to evaluate the ovarian population and characteristics of ovarian blood perfusion. NSER was performed seven days after device removal. The number of medium follicles (4.0 to 5.99 mm) on Day 11 was greater (p=.0025) in Santa Inês and Somalis Brasileira compared to Morada Nova. The number of corpora lutea on Day 15 was greater

(p<0.0001) for Santa Inês (15.3±1.4), followed by Somalis Brasileira (10.4±0.8) and then Morada Nova ewes (5.5±1.6). The ovarian area (TA, p=.02), blood flow area (DA, p=.05) and DA/TAx100% (p=.007) had greater values on Day 15 in relation to Day 11 for the Santa Inês and Somalis Brasileira ewes. The high-velocity blood flow characteristics had greater values on Day 15 in relation to Day 11, regardless of breed. For each breed, different correlations were recorded between ovarian blood flow characteristics and superovulatory response and embryo yield. In conclusion, the ovarian population and ovarian blood flow characteristics in response of the identical superovulation protocol are influenced by breed of native Brazilian ewes; however, the *in vivo* embryo production was similar among breeds.

KEYWORDS

Ovarian population, Color Doppler, Ovarian blood perfusion, Superovulation, Ewe.

1. INTRODUCTION

Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) technique has been studied to improve its efficiency and accelerate the multiplication of flocks and breeding programs (MACIEL et al., 2017). The large variability of responses obtained in MOET programs has limited the widespread of this biotechnology in sheep (BARI et al., 2001; CÉLIA et al., 2012; PINTO et al., 2020). The unpredictability of responses has been related to both intrinsic and extrinsic factors (BARTLEWSKI et al., 2016), which alone or in association can lead to total success or failure even when using identical protocols (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

The intrinsic factors that can influence the superovulatory response and viable embryos production are breed, age, follicular population present at the beginning of the superovulatory treatment, ovarian blood flow and genomic alterations (Bartlewski et al., 2016). Although the breed factor is always listed, there is still much to be elucidated. Few studies have revealed differences among ovine breeds in the number of corpora lutea, of recovered structures, and of viable embryos produced in MOET programs (AMMOUN et al., 2006; BRASIL et al., 2018b; REBOLLEDO et al., 2017). For instance, Dorper ewes showed better responses in comparison with Katahdin, Blackbelly and Pelibuey ewes (REBOLLEDO et al., 2017). The same was

reported for Rubia del Molar compared to Manchega and Negra de Colmenar breeds (AMMOUN et al., 2006). Among Brazilian native breeds, better responses were observed for Morada Nova compared to Somalis Brasileira breed (BRASIL et al., 2018). The authors of mentioned studies suggest that differences among breeds can be explained by differences in ovarian dynamics along the estrus synchronization protocols, used as basis for superovulatory treatment. The definition of appropriate protocols for the peculiarity of each breed will potentially reduce or avoid the variability of superovulatory responses and *in vivo* embryo production and, thus, greater success and applicability of biotechnology may be achieved (BRASIL et al., 2018).

Another factor that may be related to the superovulatory response and embryo production is ovarian blood perfusion. Color Doppler ultrasound has been used to predict the superovulatory responses in sheep, however, its applicability progresses slowly (BARTLEWSKI, 2019). Studies of the antral follicles blood flow in superovulated ewes pointed out that the high-velocity color Doppler signal of the follicular wall on the second day of superovulatory treatment may indicate the efficiency of superovulatory response and *in vivo* embryo production (OLIVEIRA et al., 2017) and the color Doppler signal on the fourth day of superovulatory treatment has a negative correlation with the number of unfertilized oocytes (OLIVEIRA et al., 2014) . More studies of ovarian blood flow in superovulated ewes are needed in various genotypes and sheep and for different SOV regimens.

In view of the above, the present study was designed to evaluate whether the breed influences the follicular population, ovarian blood perfusion, superovulatory response and the *in vivo* production of embryos in native Brazilian sheep breeds (Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira). Additionally, correlations between ovarian blood perfusion, superovulatory response and *in vivo* production of embryos were investigated.

2. Material and Methods

2.1 Location, ethics and experimental animals

The study was conducted at Experimental Campus of Embrapa Goats and Sheep located in Sobral, CE, Brazil (latitude 03º41'10" S and longitude 40º20'59" W), from October to November. All procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of Embrapa Dairy Cattle (CEUA/EGL) (No. 2512100516).

Thirty healthy multiparous ewes of native Brazilian breeds (Morada Nova - MN, Santa Inês - SI, Somalis Brasileira - SB, n = 10/breed), with an average age of 5.0 ± 0.3 years and body condition score of 2.7± 0.0 (scale from 1 to 5, when 1 = emaciated and 5 = obese) (MN = 2.8 ± 0.1, SI = 2.8 ± 0.1e SB = 2.5 ± 0.1), 36.7 ± 1.6 kg of body weight (MN = 33.9 ± 1.7, SI = 46.7 ± 1.3 e SB = 28.6 ± 0.9) and at 149.8 ± 0.5 days post-partum (mean ± SEM) were used in this experiment The animals were kept in collective pens, receiving silage grass and balanced feed, in addition to mineral salt and water *ad libitum.*

2.2 Superovulation protocol and mating

The estrus synchronization protocol used in this study was based on the one described by Figueira et al. (2020). In brief, on a random day of the estrous cycle (Day 0); all ewes received an intravaginal device impregnated with 0.33 g of progesterone (EAZI-BREED CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brazil) for nine days. At 60 h before device removal (Day 6.5), the superovulatory treatment with 133 mg pFSH (Folltropin®-V, Bioniche Animal Health Canada Inc., Belleville, ON, Canada) was started, and consisted in the administration of six decreasing doses (25%, 25%, 15%, 10% and 10%) every 12 h. Concomitantly to the 5th and 6th doses of pFSH, doses of 37.5 µg of d-cloprostenol (Prolise®; Tecnopec, São Paulo, Brazil) were administered i.m.. On Day 10 (12 h after device removal), ewe estrus behavior was observed using vasectomized rams. Ewes and teaser were kept together twice (8 a.m. and 4 p.m.) daily for 30 min for three days. All females presenting estrus were naturally mated with rams of the same breed, previously tested by andrological evaluation. Each female was matted three times with intervals of 12 h. To prevent premature regression of the corpora lutea (CL), 6.75 mg of flunixin meglumine (Banamine®, MSD Saúde Animal, Cruzeiro, Brazil) was administered i.m. in three equivalent doses on Days 12 (72 h after device removal), 13 and 15 of the protocol (Figure 1).

2.3 Ultrasound assessment

Ultrasonographic evaluations of the ovaries were performed on Days 11 (36 h after device removal; time corresponding to the final development of ovulatory follicular wave) and 15 (12 h before embryo collection; initial luteal phase) in all animals. The ultrasound exams were performed using Z5 Vet ultrasound equipment (Mindray, China), coupled to a multi-frequency transrectal transducer at 8.5 MHz frequency. By B-mode ultrasonography, all antral follicles with ≥ 2 mm of diameter, as well as the visible CL were measured by means of two dimensions (vertical and horizontal) and used to calculate their mean. Color Doppler ultrasound was performed to identify the presence of ovarian blood perfusion. The configurations of the ultrasound equipment were standardized for B-mode (depth of 4.6 cm; gain of 90%; frame rate of 55 frames/seconds and dynamic range of 120 dB) and color Doppler mode (frequency 5.7 MHz, gain of 50%, color wall filter 183 Hz and pulse repetition frequency 1.1 kHz).

2.4 Non-surgical embryo recovery

Uterine flushing for non-surgical embryo recovery (NSER) was conducted seven days after the device removal. All females received a cervical dilation protocol consisting of 37.5 µg d-cloprostenol (Prolise®; Tecnopec, São Paulo, Brazil) and 1 mg of estradiol benzoate (EB; Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brazil) both i.m. 16 h prior to embryo collection and also 50 IU of oxytocin i.e. (OT; Oxytocin forte®, UCB, São Paulo, Brazil) 20 min before NSER procedure. The NSER technique was conducted as previously described by our group (Fonseca et al., 2019; Figueira et al., 2020). The recovered liquid was filtered and evaluated by stereomicroscope. All recovered structures were classified according to the International Embryo Society Transfer manual (Stringfellow & Givens, 2010).

2.5 Analyses of ultrasound images

The ultrasound images in color Doppler mode were analyzed and classified as described by Díaz et al. (2019), with some modifications. In summary, images from three consecutive frames of each ovary were selected, which presented the strongest Doppler signal. These analyses were determined by total ovarian area

(TA), blood flow area (DA) and high-velocity blood flow area (HVBFA) as reported by Oliveira et al. (2017) (Figures 2, 3 and 4). For the latter variable, the scale bar of the velocity of vascularization present was divided into 64 lines of visibly distinct colors and the top one-quarter (16 rows) and the bottom one-quarter (16 rows) of the scale bar were isolated.

2.6 End points and statistical analysis

The following data were recorded for all groups of ewes: (i) on Day 11 the population and blood perfusion characteristics of ovaries were registered: total number of antral follicles (≥ 2 mm); diameter of the largest follicle (mm); number of large follicles (≥ 6 mm); average diameter of large follicles (mm); number of medium follicles (4.0 to 5.99 mm); average diameter of medium follicles (mm); number of small follicles (≤ 3.99 mm); average diameter of small follicles (mm); TA (mm^2); DA (mm^2); HVBFA (mm^2); percentage of Doppler area (DA / TA × 100%); percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area (HVBFA / TA x 100%); percentage of HVBFA in relation to the total Doppler area (HVBFA / DA x 100%); (ii) estrus behavior data were: estrus response (percentage of females that manifested estrus after device removal); interval from device removal to estrus onset (h); estrus duration (h); (iii) on Day 15 the population and blood perfusion characteristics of ovaries were registered: number of CL from all ewes; number of CL from responding ewes (ewes that had ≥ 4 CL); number of luteinized unovulatory follicles; superovulatory (SOV) status (score 0: 0 - 3 CL; ewes that did not respond to superovulatory treatment; score 1: 4 to 10 CL; score 2: 11 to 15 CL; and score 3: ≥ 16 CL); ovarian area (mm^2); blood flow area (mm^2); DA / TA × 100%; HVBFA / TA x 100%; and HVBFA / DA x 100%; and (iv) embryo yield data were: number of recovered structures; recovery rate (number of recovered structures/number of CL x 100); number of viable embryos; viability rate (number of viable embryos/number of recovered structures x 100); and embryo status (score 0: ewe that have not been collected; score 1: 0 viable embryos; score 2: 1 to 7 viable embryos; score 3: 8 to 14 viable embryos; and score 4: ≥ 15 viable embryos).

Data normality was determined by the Shapiro-Wilk Test. The variables obtained at sequential moments were analyzed by PROC MIXED of SAS (SAS Inst.,

Inc., Cary, NC, USA). In the model, the fixed effects of breed, days of ultrasound evaluation and their interaction were included for comparison of parametric data using the analysis of variance of repeated bidirectional measurements (ANOVA) and the Tukey test. The variables obtained at one time were compared among groups (breed effect) by one-way ANOVA and Tukey test. The homogeneity of variance was tested used Bartlett's test ($p > .05$). The Spearman correlation test was performed to verify the correlation between the variables of ovarian blood perfusion, superovulatory response and embryo production by GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). The value of $p < .05$ was considered significant.

3. Results

All ewes presented estrus after device removal. The interval from device removal to estrus onset was longer ($p = .009$) in Somalis Brasileira (33.6 ± 3.5 h) compared to Morada Nova (25.0 ± 2.7 h) and Santa Inês (20.8 ± 1.8 h) ewes. The estrus duration did not differ ($p = .49$) among breeds (22.4 ± 1.2 h). According to the ovarian follicular population present on Day 11, the number of medium follicles (4.0 to 5.99 mm) was higher ($p = .0025$) in Santa Inês and Somalis Brasileira compared to Morada Nova ewes (Table 1). The variables: Total number of antral follicles (≥ 2 mm), Diameter of the largest follicle (mm), Number of large follicles (≥ 6 mm), Average diameter of medium follicles (mm) and Number of small follicles (≤ 3.99 mm) of the ovarian antral follicle population on Day 11 did not showed homogeneous residual variance.

Four Morada Nova ewes did not respond to superovulatory treatment (i.e., they had ≤ 3 CL) and three (one from each breed) did not obtain adequate cervical dilation to perform the NSER. These seven animals did not undergo embryo recovery. The greater values ($p < .0001$) were observed in Santa Inês, followed by Somalis Brasileira and then Morada Nova breed. The number of luteinized unovulatory follicles, number of recovered structures, recovery rate, number of viable embryos, viability rate and embryo status did not differ among breeds ($p > .05$). The superovulatory response demonstrated homogenous residual variance about number

of recovered structures and number of viable embryos, the other variables were homogenous ($p > .05$) (Table 2).

There was interaction between breed and days of ultrasound evaluation for the ovarian blood perfusion variables, ovarian area ($p = .02$), blood flow area ($p = .05$) and percentage of Doppler area ($p = .007$) (Figure 5). The ovarian area and blood flow area on Day 15 were larger ($p < .001$) for Santa Inês and Somalis Brasileira ewes compared to Morada Nova ewes and when compared to Day 11. The increased ($p < .0001$) from Day 11 to Day 15 occurred in all breeds. On Day 11 the percentage of Doppler area was higher ($p = .007$) for Santa Inês ewes compared to Morada Nova ewes, and on Day 15 this rate in Morada Nova ewes was lesser compared to the other two breeds. The high-velocity blood flow area, percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area and percentage of HVBFA in relation to total Doppler area had greater values ($p < .0001$) on Day 15 compared to Day 11.

The correlations evidenced between the ovarian blood perfusion characteristics and superovulatory response and *in vivo* embryo production for Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira ewes are shown in Figures 6, 7 and 8, respectively. Most characteristics of ovarian blood perfusion (i.e. blood flow area, high-velocity blood flow area, percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area, percentage of HVBFA in relation to total Doppler area and percentage of Doppler area) observed on Day 11 showed strong correlations ($r > 0.7$) between themselves, in all breeds. The ovarian area was positively correlated ($r > 0.7$) with the total blood flow area in the Santa Inês and Somalis Brasileira breeds, and with the high-velocity blood flow area only in the Santa Inês breed. The correlations between the ovarian blood perfusion variables on Day 11 and Day 15 were punctual, being presented only in Somalis Brasileira breed (ovarian area and percentage of HVBFA in relation to total Doppler area , $r = 0.7$) and in the Santa Inês breed (ovarian area and blood flow area,($r = 0.6$) and with high-velocity blood flow area, $r = 0.6$). All the characteristics of ovarian blood perfusion observed on Day 15 showed strong positive correlations ($r > 0.8$) between themselves in Morada Nova breed. However, in the other breeds, the correlations between the variables of ovarian blood perfusion on Day 15 were not evident. In Santa Inês ewes the area of high-velocity blood flow had strong correlations ($r > 0.8$) with all other variables of ovarian blood perfusion

and the variable percentage of Doppler area only was not correlated with the ovarian area. Strong correlations (r > 0.8) in Santa Inês ewes were observed between: ovarian area and ovarian blood flow area; percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area and percentage of HVBFA in relation to total Doppler area. In Somalis Brasileira ewes, the high-velocity blood flow area had strong correlation (r > 0.7) with all other variables of ovarian blood perfusion, except with percentage of HVBFA in relation to total Doppler area. Moreover, in this breed the ovarian area had strong correlations (r > 0.8) with the blood flow area and with percentage of Doppler area and percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area with percentage of HVBFA in relation to total Doppler area (r = 0.6).

Correlations between ovarian blood perfusion variables on Day 11 and superovulatory response and *in vivo* embryo production were observed only in Morada Nova and Somalis Brasileira ewes, with differences between breeds. In Morada Nova ewes, all variables of ovarian blood perfusion were correlated with embryo status (r > 0.6), except the ovarian area. The number of CL was correlated (r > 0.7) with all variables of ovarian blood perfusion, except for the ovarian area and blood flow area. There were also correlations between: SOV status with area of blood flow and with percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area (r > 0.7); number of viable embryos with area of blood flow, with percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area and with percentage of Doppler area (r = 1.0). In Somalis Brasileira ewes, the number of recovered structures was negatively correlated (r > - 0.7) with the variables: high velocity flow area, percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area, percentage of Doppler area.

The ovarian blood perfusion variables observed on Day 15 had more correlations with the variables of superovulatory response and embryo production in Morada Nova breed. The number of CL, number of luteinized unovulatory follicles and SOV status were correlated (r > 0.6) with all variables of ovarian blood perfusion on Day 15. Moreover, the embryo status was correlated (r = 0.6) with the ovarian area. For the other breeds, the correlations were punctual. In Santa Inês ewes, correlations were observed between ovarian blood flow area and number of viable embryos and with embryo status (r > 0.7); high-velocity blood flow area and number of viable embryos (r = 0.8); and percentage of HVBFA in relation to the total ovarian

area and number of recovered structures (r = 0.8). In the Somalis Brasileira ewes correlation only for percentage of HVBFA in relation to the total ovarian area and percentage of HVBFA in relation to total Doppler area with SOV status (r = 0.7) and percentage of HVBFA in relation to total Doppler area with the number of CL (r = 0.8) were found. Few correlations were observed between the variables of superovulatory response and embryo production in the three sheep breeds. The number of CL was correlated with the SOV status in the Morada Nova and Somalis Brasileira breeds (r > 0.8). The number of luteinized unovulatory follicles and SOV status were correlated (r > 0.6) in Morada Nova and Santa Inês ewes. In the Santa Inês ewes correlation (r = 0.7) was also observed between the number of luteinized unovulatory follicles and the number of recovered structures. In the Morada Nova ewes there were correlations between the number of luteinized unovulatory follicles and embryo status (r > 0.6); and SOV status and embryo status (r = 0.8). In Somalis Brasileira ewes correlations of the variables number of recovered structures, number of viable embryos and embryo status were recorded between themselves (r > 0.8).

4. Discussion

The present study showed differences among native Brazilian sheep breeds for superovulatory responses (i.e. number of medium follicles on Day 11 and number of CL on Day 15); however, the *in vivo* embryo production after NSER was similar. The ovarian area and total blood flow perfusion were greater in ovaries with CL compared with preovulatory follicles as well as are related to the number of ovarian structures present. Meanwhile, the high-velocity blood flow variables are related only to the type of ovarian structures present. In addition, different correlations between ovarian blood flow characteristics and superovulatory response and embryo production recorded between the native Brazilian sheep breed indicate that the ovarian ultrasound assessments performed after the end of the superovulatory treatment can predict results, especially in ewes with low responses.

The 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol used in the current study was efficient to induce estrus in all ewes. The differences among breeds seen for the interval from device removal to estrus onset were unrelated to the preovulatory follicles population. In addition, the ovarian population present on

Day 11 revealed greater number of medium follicles in Santa Inês and Somalis Brasileira than Morada Nova, while the number of CL on Day 15 was greater for Santa Inês, following for Somalis Brasileira and then Morada Nova. These results indicate that the ultrasound evaluation to count the preovulatory follicle population can be an early tool for determining the superovulatory response, however, it cannot be disregarded that the ovulation rate is not always 100%. Similarly, Ammoun et al. (2006) reported that the ovarian follicular population (i.e. number of 4 mm follicles) at the device removal time early indicated ewes with better superovulatory responses.

Different superovulatory responses were recorded between other sheep breeds by Ammoun et al. (2006), Swelum et al. (2014) and Rebolledo et al. (2017), corroborating with the present study. Brasil et al. (2018) also using native Brazilian sheep demonstrated greater numbers of CL, recovered structures and viable embryos for Morada Nova than Somalis Brasileira ewes. The difference in results in relation to the present study may be related to the fact that the mentioned study has used a long-term (14-days) estrus synchronization protocol. Progesterone-based protocols with different durations have shown different responses. The short-term (6.5 days) protocol result in better superovulatory response compared with long-term (14.5 days) ones (OLIVEIRA et al., 2020). In addition, when short- (6 days) and medium- term (9 days) protocols was compared, the number of follicles with 4.1–5.0 mm and greater number of CL and embryo yield were observed to Lacaune ewes treated with 9-days progesterone-based estrus synchronization protocol associated to 133 mg of pFSH (FIGUEIRA et al., 2020). Thus, although the protocol used has an important effect on responses, females of different breeds can respond differently to identical protocols.

Differences between breeds for superovulatory response may also be the result of physiological characteristics to each breed, such as the prolificacy rate (DUFOUR et al., 2000). Morada Nova has a greater prolificacy rate when compared to the Somalis Brasileira and Santa Inês breed (RAJAB et al., 1992). Despite this fact, the present study showed that the Morada Nova breed had the poorest superovulatory response. Similarly, Rebolledo et al. (2017) also described that Dorper ewes with low prolificacy had better superovulatory responses compared to the breeds with higher prolificacy rate, such as Blackbelly, Katahdin and Pelibuey.

This fact may have correlation the physiological multiple ovulation and the genes BMP15 and GDF9 are associate with increased ovulation rate (MOORE; ERICKSON; SHIMASAKI, 2004). The genetic alterations related about these genes were related the FecXI and FecXH polymorphism (GALLOWAY et al., 2000), FecBB (MULSANT et al., 2001; SOUZA et al., 2001), FecGH polymorphism (HANRAHAN et al., 2004) and FecGE (SILVA et al., 2011). The FecGE in Santa Inês ewe is a variant gene that represent a new sheep reproductive phenotype; the homozygotes are not sterile and have increased prolificacy, which differ of other documented variants genetic for GDF9 (SILVA et al., 2011). Given the above, it is important to emphasize the need to expand the research in this context.

To the best of our knowledge this is the first study that has investigated characteristics of ovarian blood perfusion in superovulated ewes under the effect of the breed. The ovarian area, blood flow area and percentage of Doppler area were influenced by the interaction of the effects studied; increase from the follicular phase to the luteal phase were observed in the Santa Inês and Somalis Brasileira ewes. As expected, the ovarian characteristics differed according to the ovarian population present, and their values are higher in ovaries with CL in relation to preovulatory follicles. Besides presenting larger dimensions CL are constituted by a rich blood perfusion network, leading to a higher demand of ovarian blood supply. In addition, the lowest values for these variables for Morada Nova ewes on Day 15 are possibly related to the lower CL number. Therefore, the ovarian area and its blood perfusion characteristics seem to be related to the type of structure present (i.e. follicle vs. CL), as well as this number.

High-velocity blood flow of ovaries was investigated in superovulation ewes to evaluate a possible non-invasive method to predict superovulatory outcome (OLIVEIRA et al., 2017). In the present study, the variables related to ovarian high-velocity blood flow (i.e. high velocity flow area, HVBFA/TA x 100% and HVBFA/DA x 100%), as seen for total blood flow characteristics, were greater on Day 15 compared to Day 11. Once again, the relation of the ovarian blood perfusion characteristics to its population is indicated. The number of CL does not seem to have been fully determinant for the ovarian blood flow of high velocity, since it was observed only a trend among the breeds.

Strong correlations between the ovarian blood perfusion characteristics and the superovulatory response and embryo production were indicated; however, great differences among breeds were noted. Most of the strongly positive correlations between the ovarian blood perfusion characteristics on Days 11 and 15 and the superovulatory and embryo production responses were observed in Morada Nova ewes, which had the lowest superovulatory results. Meanwhile, the correlations were punctual in Santa Inês and Somalis Brasileira ewes. These findings suggest that the blood perfusion characteristics can predict the superovulatory response of ewes, especially when they are low. Positive correlation between high-velocity blood flow one day after the start of treatment and ovulation rate and number of viable embryos have already been described in Santa Inês sheep (OLIVEIRA et al., 2017). In addition, most characteristics of ovarian blood perfusion observed on Day 11, except the ovarian area, showed strong correlations among breeds. The other correlations were divergent among native Brazilian sheep.

5. CONCLUSION

The breed influenced the number of medium follicles on Day 11 and the number of CLs on Day 15 of Brazilian native breeds; however, the number of viable embryos was not affected among the different breeds. The characteristics of ovarian blood perfusion are altered conform the population ovarian present and can still be predictors of superovulatory responses. The determination of breed-specific protocols is indicated, nevertheless, more studies are necessary to tailor the protocols for each sheep breed.

REFERENCES

AMMOUN, I. et al. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 896–905, 2006.

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

BARI, F. et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in

sheep. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 147–155, 2001.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 130–143, 2016.

BARTLEWSKI, P. M. Recent advances in superovulation in sheep. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. June, p. 126–128, 2019a.

BARTLEWSKI, P. M. Applications of Doppler ultrasonography in reproductive health and physiology of small ruminants. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. June, p. 122–125, 2019b.

BRASIL, O. . et al. Produção de embriões em ovinos Morada Nova e Somalis Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1390–1394, 2018.

CAHILL, L. P.; DUFOUR, J. Follicular populations in the ewe under different gonadotrophin levels. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 19, n. 5, p. 1475–1481, 1979.

CANDAPPA, I.; BARTLEWSKI, P. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 3, p. 162–175, 2011.

CÉLIA, L. et al. Effect of flunixin meglumine and hcg at commercial programs for multiple ovulation and embryo transfer (moet) in sheep. **Archieves of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 63–69, 2012.

FONSECA, J. F. et al. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 1, p. 118–125, 2019.

DÍAZ, P. U. et al. Hemodynamic changes detected by Doppler ultrasonography in the ovaries of cattle during early development of cystic ovarian disease. **Animal Reproduction Science**, v. 209, n. February, p. 106164, 2019.

DUFOUR, J. J. et al. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 85–94, 2000.

FIGUEIRA, L. M. et al. **P**reovulatory follicular dynamics, ovulatory response and

embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and non-surgical embryo recovery. [s.l.] **Elsevier Inc.,** 2020. v. 145

FONSECA, J. F. et al. **Biotecnologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite Embrapa Caprinos e Ovinos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. [s.l: s.n.].

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–283, 2000.

GARCIA-GUERRA, A. et al. Mechanisms regulating follicle selection in ruminants: Lessons learned from multiple ovulation models. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Irrs, p. 660–679, 2018.

GONÇALVES, J. . et al. Desempenho reprodutivo de ovelhas das raças Morada Nova e Somalis Brasileira criadas na região Nordeste do Brasil. **VII Congresso Nordestino de Produção Animal**, p. 2–4, 2012.

GONZALEZ-AÑOVER, P. et al. Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 29–33, 2007.

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 421–435, 2004.

HANRAHAN, J. P. et al. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (Ovis aries)1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 900–909, 2004.

MACIEL, G. S. et al. Ovarian Superstimulation Treatment for Multiple Ovulation and Embryo Transfer Programs in Sheep. **Investigação**, v. 16, n. 8, p. 30–36, 2017.

MOORE, R. K.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 356–361, 2004.

MORAIS, O. .; MADALENA, F. . **Economic Values for Production Traits in Santa Inês Sheep.** p. 6–9, 2006.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5104–5109, 2001.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 1–2, p. 30–37, 2014

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Relationship of antral follicular blood flow velocity to superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 182, p. 48–55, 2017

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 742–750, 2018.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Repeated trans-cervical embryo recoveries in Santa inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. **Animal Reproduction Science**, v. 217, n. April, p. 106469, 2020.

PINTO, P. H. N. et al. Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 266–269, 2018.

PINTO, P. H. N. et al. Successive in vivo embryo production in Santa Inês sheep. **Animal Production Science**, v. 60, n. 4, p. 497–502, 2020.

RAJAB, M. H. et al. Performance of three tropical hair sheep breeds. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3351–3359, 1992.

REBOLLEDO, Á. D. et al. Follicular population at the onset of a superovulatory treatment and ovarian response in hair ewes. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 22, n. 2, p. 12427–12431, 2017.

SILVA, B. D. M. et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 89–92, 2011.

SOUZA, C. J. H. et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. **Journal of**

Endocrinology, v. 169, n. 2, p. 3–8, 2001.

SWELUM, A. A. A.; AL-OWAIMER, A. N.; ABOUHEIF, M. A. Effects of breed and number of embryos transferred on the efficacy of MOET in sheep. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 13, n. 2, p. 98–103, 2014.

TORRÈS, S.; COGNIÉ, Y.; COLAS, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. **Theriogenology**, v. 27, n. 2, p. 407–419, 1987.

List of Figures:

Figure 1. Schematic representation of the experimental procedures used to evaluate the effect of the breed in native Brazilian sheep (Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira) submitted to a 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administered in six decreasing doses starting 60 h before device removal and collected by non-surgical embryo recovery (NSER).

Figure 2. A color Doppler ultrasonographic image showing the presence of positive signals of blood flow intensity being evaluated in Image Pro Plus software to measure the ovarian area of native Brazilian sheep Santa Inês submitted to a 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal.

Figure 3. A color Doppler image showing the presence of positive signals of blood flow intensity and measure of the blood flow area of native Brazilian sheep Santa Inês submitted to a 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal.

Figure 4. Example color Doppler image showing the presence of positive signals of blood flow intensity and measure of the high-velocity blood flow area (0.055–0.11 m/s; denoted by green rectangles) of native Brazilian sheep Santa Inês submitted to a 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal]

Figure 5. Ovarian blood perfusion characteristics (mean ± SEM) according breed and days of evaluation of native Brazilian sheep (Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira) submitted to a 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal.

Figure 6. Heatmap of the correlation between ovarian blood perfusion variables (Day 11 and Day 15), superovulatory response and embryo production in Morada Nova ewes treated with a 9-days progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal. Cold colors (blue) indicate a positive correlation, warm colors

(red) indicate a negative correlation, white colors (X) indicate no significant correlation ($p < .05$).

Figure 7. Heatmap of the correlation between ovarian blood perfusion variables (Day 11 and Day 15), superovulatory response and embryo production in Santa Inês ewes treated with 9-days progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal. Cold colors (blue) indicate a positive correlation, warm colors (red) indicate a negative correlation, white colors (X) indicate no significant correlation ($p < .05$).

Figure 8. Heatmap of the correlation between ovarian blood perfusion variables (Day 11 and Day 15), superovulatory response and embryo production in Somalis Brasileira ewes treated with a 9-days progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal. Cold colors (blue) indicate a positive correlation, warm colors (red) indicate a negative correlation, white colors (X) indicate no significant correlation ($p < .05$).

Table 1. Ovarian antral follicle population (mean ± SEM) on Day 11 (36 h after device removal) from native Brazilian ewes (Morada Nova, Santa Inês and Somalis Brasileira) treated with a 9-day progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal.

End. points	Morada Nova	Santa Inês	Somalis Brasileira	p value	Bartlett's test *
Total number of antral follicles (≥ 2 mm)	18.7 ± 2.2	31.3 ± 5.5	26.6 ± 3.0	0.08	0.025
Diameter of the largest follicle (mm)	5.9 ± 0.5	6.1 ± 0.4	5.4 ± 0.2	0.39	0.009
Number of large follicles (≥ 6 mm)	0.9 ± 0.6	1.1 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.25	<0.001
Average diameter of large follicles (mm)	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.1	6.2 ± 0.0	0.74	0.167
Number of medium follicles (4.0 to 5.99 mm)	3.9 ± 0.8[b]	10.0 ± 1.3[a]	8.8 ± 1.4[a]	0.002	0.213
Average diameter of medium follicles (mm)	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.0	4.6 ± 0.1	0.98	<0.0001
Number of small follicles (≤ 3.99 mm)	13.9 ± 1.9	20.2 ± 5.2	17.7 ± 2.1	0.43	0.003
Average diameter of small follicles (mm)	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1	0.93	0.116

* Bartlett's test is used to evaluate the variances of data ($p > .05$).

Table 2. Superovulatory responses and *in vivo* embryos production (mean ± SEM) from Brazilian native ewes (Morada Nova, Santa Inês, Somalis Brasileira) treated with a 9-days progesterone-based estrus synchronization protocol associated with 133 mg of pFSH administrated in six decreasing doses started 60 h before device removal.

End points	Morada Nova	Santa Inês	Somalis Brasileira	P value	Bartlett's test ***
SOV status *	0.8 ± 0.3^{c}	2.4 ± 0.2^{a}	1.5 ± 0.2^{b}	<0.0001	0.212
Number of CL from all experimental ewes	5.5 ± 1.6^{c} (1 - 18)	15.3 ± 1.4^{a} (8 - 24)	10.4 ± 0.8^{b} (6 - 14)	<0.0001	0.142
Number of CL from ewes with ≥ 4 CL	7.8 ± 2.2^{b} (4 – 18)	15.3 ± 1.4^{a} (4 – 24)	10.4 ± 0.8^{b} (4 – 14)	0.004	0.14
Number of luteinized unovulatory follicles	1.8 ± 0.6 (0 - 4)	0.9 ± 0.3 (0 - 3)	1.3 ± 0.6 (0 - 6)	0.45	0.187
Number of recovered structures	7.6 ± 2.2	13.3 ± 5.3	6.4 ± 1.1	0.37	<0.001
Recovery rate (%)	79.0 ± 20.3	73.8 ± 22.9	62.0 ± 10.6	0.81	0.130
Number of viable embryos	6.6 ± 2.7	10.8 ± 5.1	5.3 ± 1.4	0.53	0.003
Viability rate (%)	66.7 ± 21.1	70.7 ± 12.1	76.0 ± 13.3	0.91	0.67
Embryo status **	1.1 ± 0.4	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.3	0.11	0.748

* score 0: 0 - 3 CL; score 1: 4 to 10 CL; score 2: 11 to 15 CL; and score 3: ≥ 16 CL.
** score 0: animals not collected; score 1: 0 viable embryo; score 2: 1 to 7 viable embryos; score 3: 8 to 14 viable embryos; and score 4: ≥ 15 viable embryos.
( ) range. *** Bartlett's test is used to evaluate those variances of data ($p > .05$).

Fig. 1

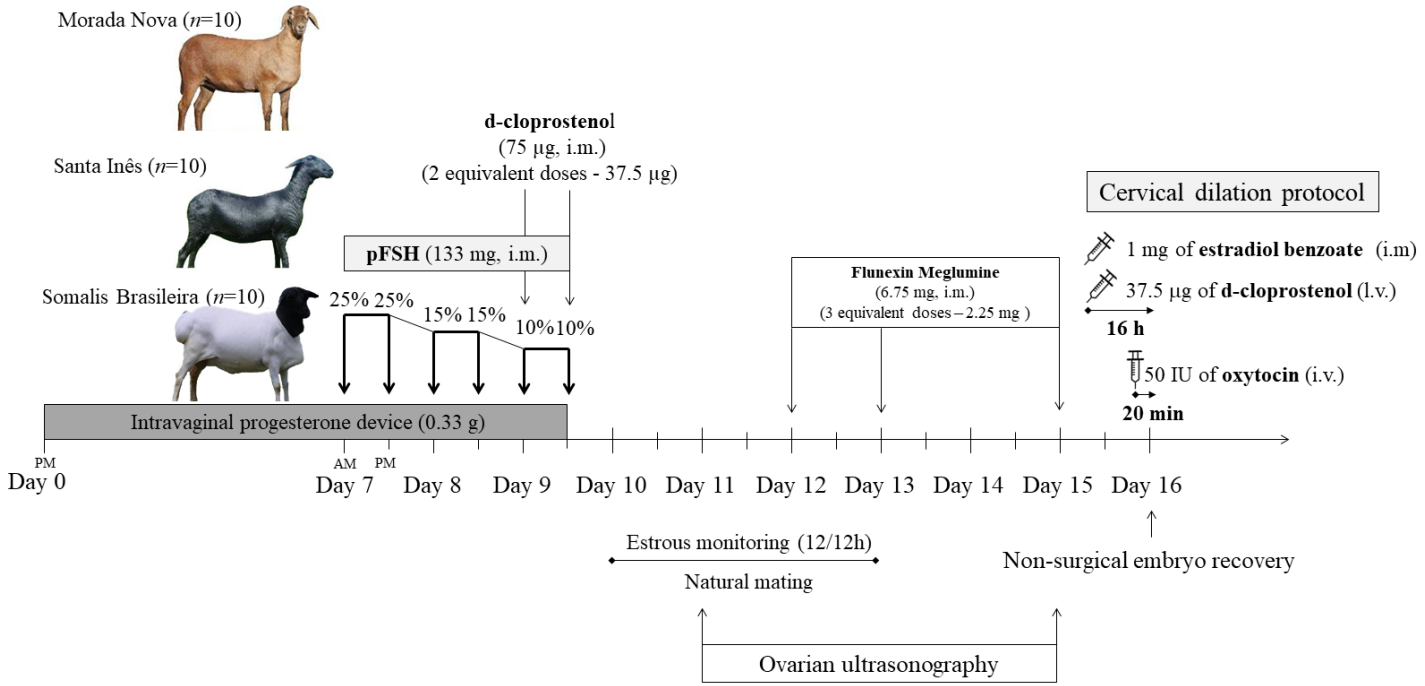

Morada Nova (n=10)
Santa Inês (n=10)
Somalis Brasileira (n=10)
d-cloprostenol
(75 µg, i.m.)
(2 equivalent doses - 37.5 µg)
pFSH (133 mg, i.m.)
25% 25%
15% 15%
10%10%
Flunexin Meglumine
(6.75 mg, i.m.)
(3 equivalent doses – 2.25 mg)
Cervical dilation protocol
1 mg of estradiol benzoate (i.m)
37.5 µg of d-cloprostenol (l.v.)
16 h
50 IU of oxytocin (i.v.)
20 min
Intravaginal progesterone device (0.33 g)
PM
Day 0
AM
PM
Day 7
Day 8
Day 9
Day 10
Day 11
Day 12
Day 13
Day 14
Day 15
Day 16
Estrous monitoring (12/12h)
Natural mating
Non-surgical embryo recovery
Ovarian ultrasonography

Fig. 2

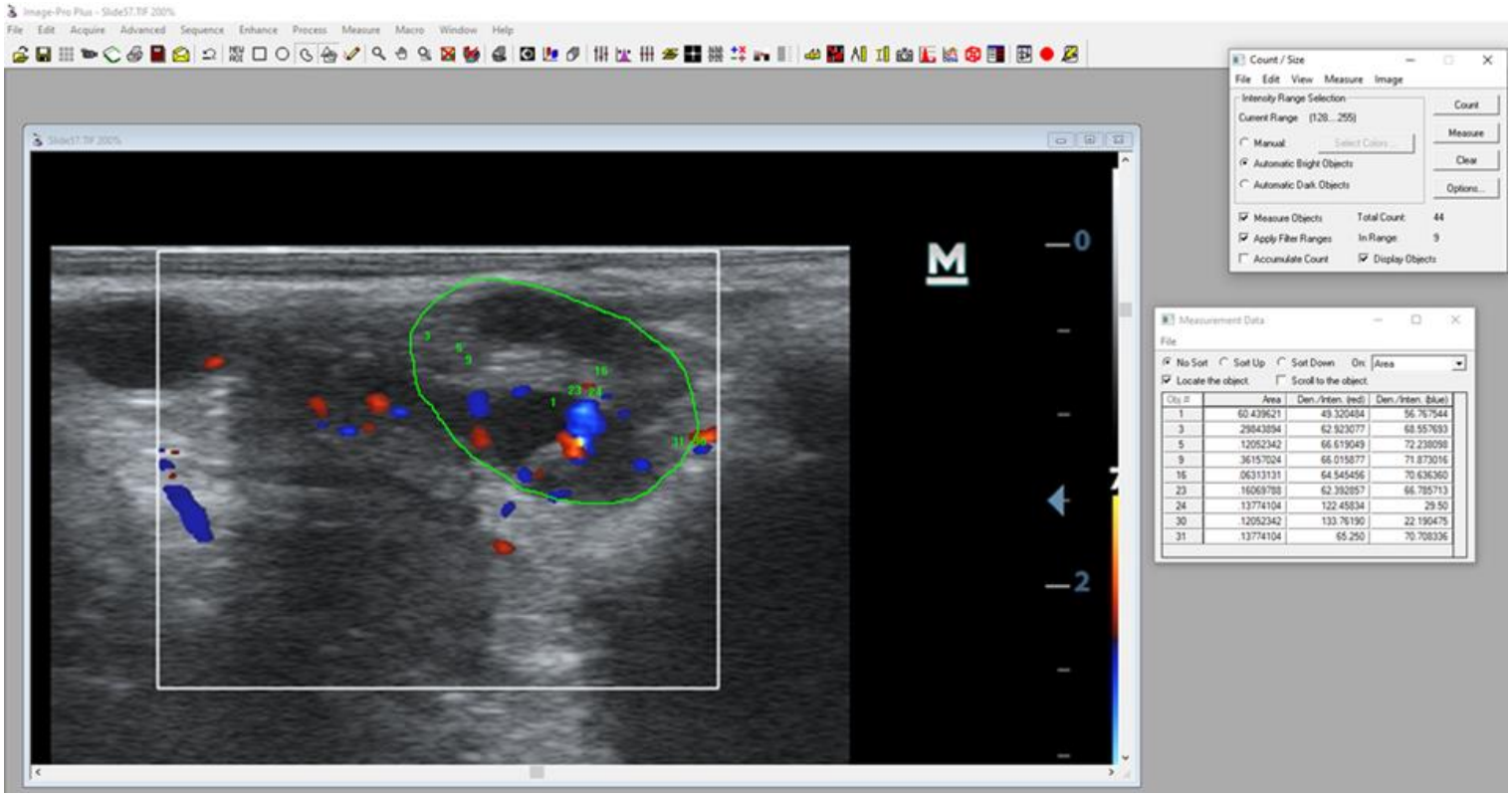


Fig. 3.

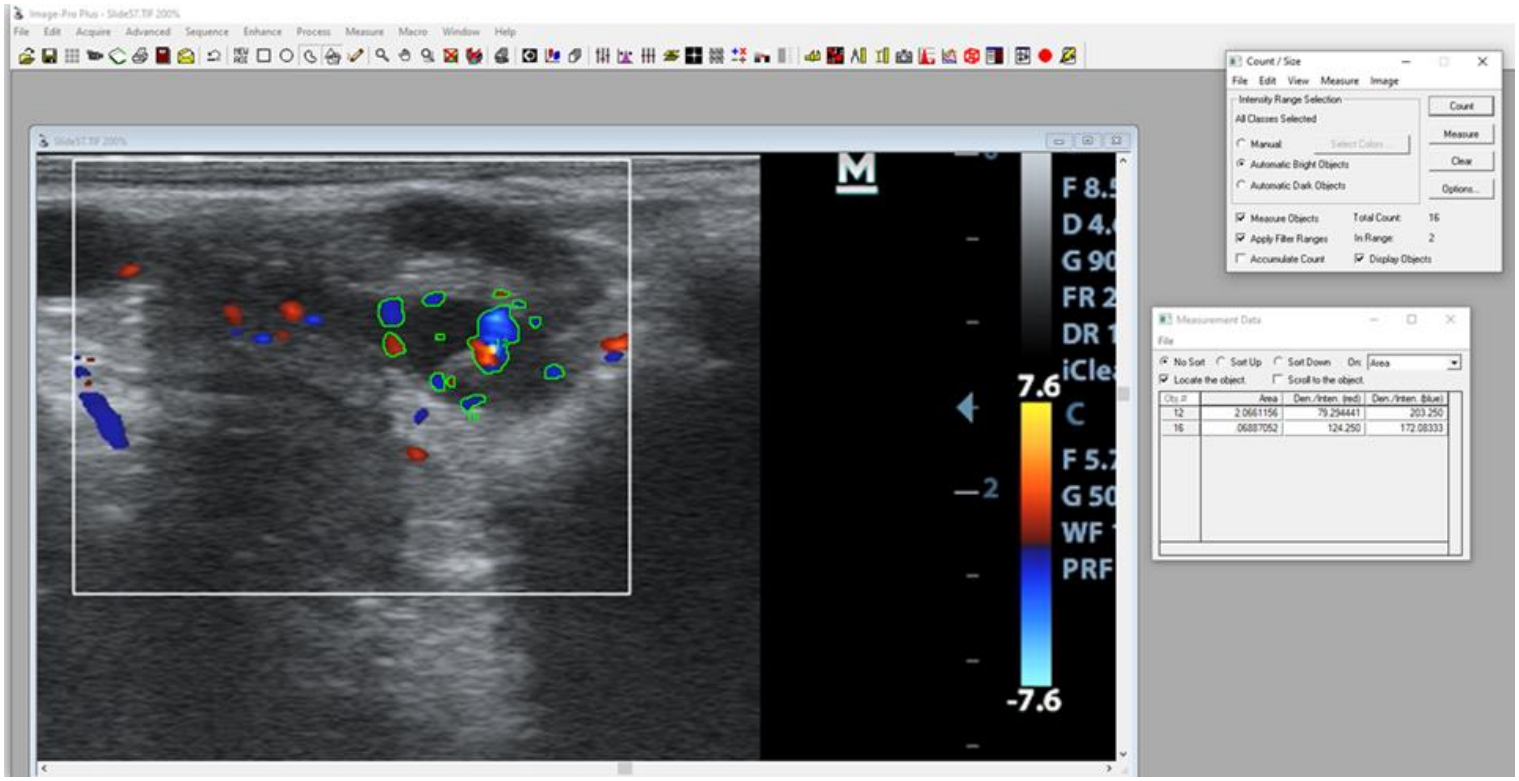


Fig. 4.

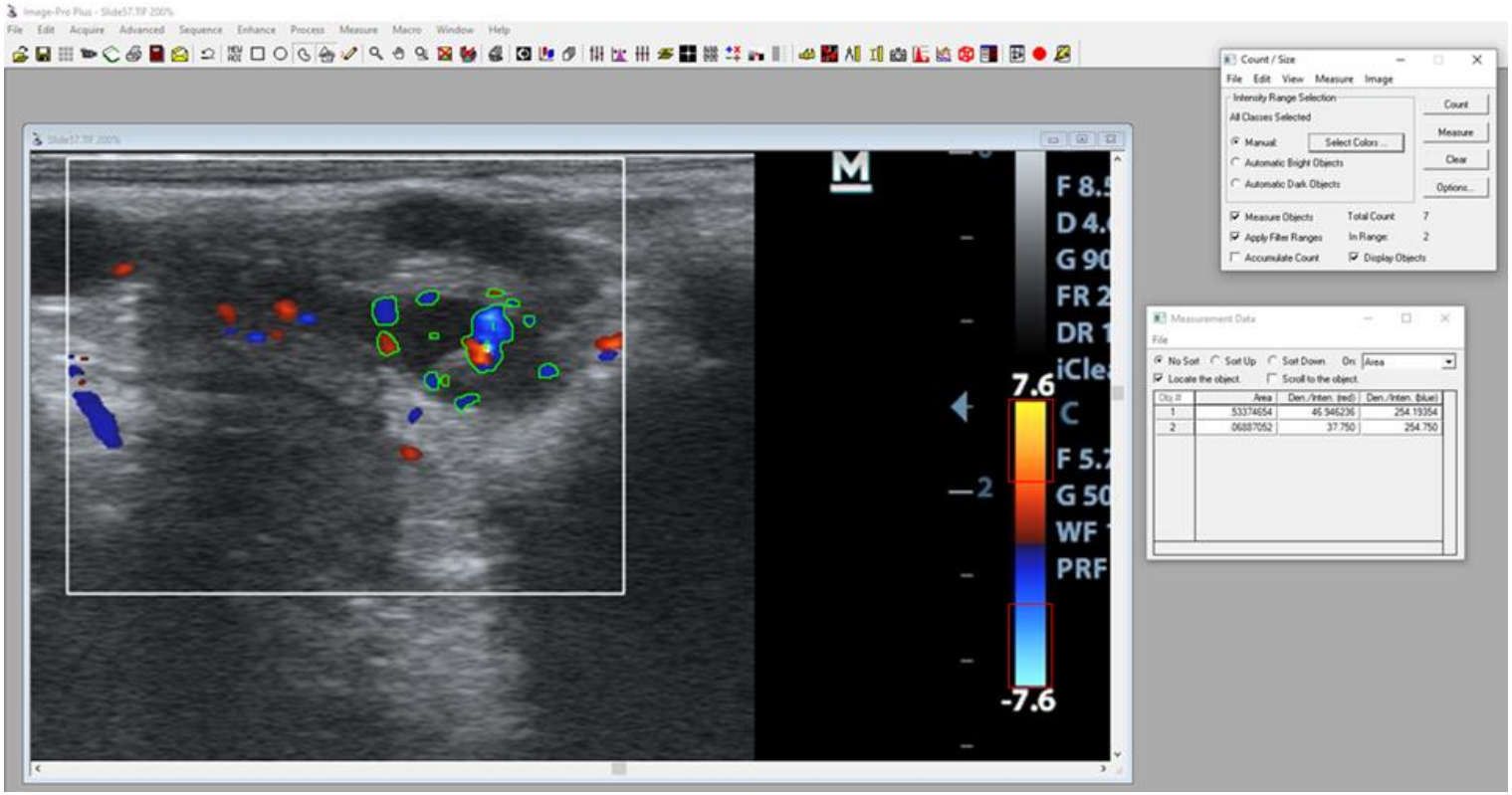


Fig. 5

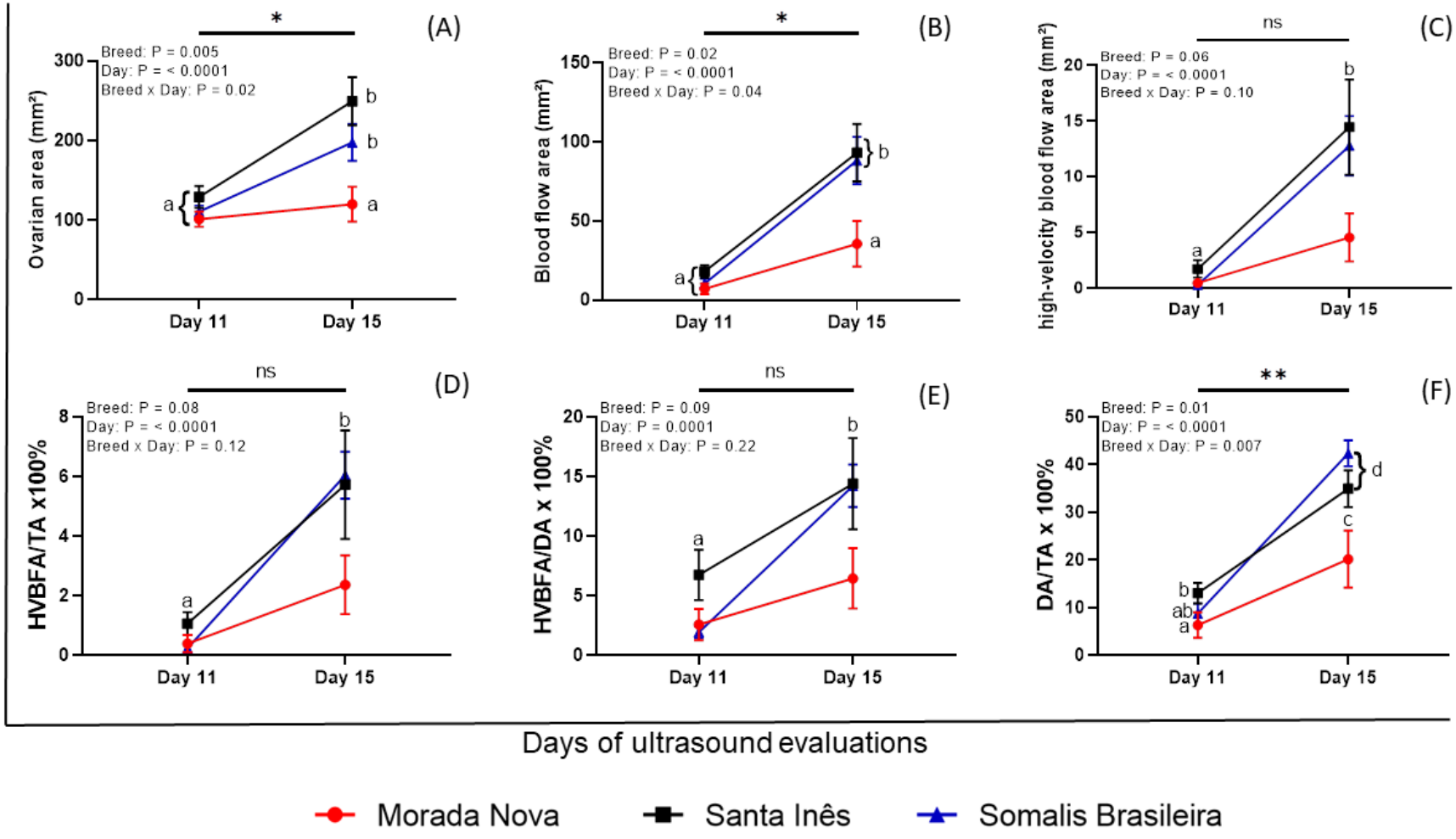

(A)
Breed: P = 0.005
Day: P = < 0.0001
Breed x Day: P = 0.02
Ovarian area (mm²)
(B)
Breed: P = 0.02
Day: P = < 0.0001
Breed x Day: P = 0.04
Blood flow area (mm²)
(C)
Breed: P = 0.06
Day: P = < 0.0001
Breed x Day: P = 0.10
high-velocity blood flow area (mm²)
(D)
Breed: P = 0.08
Day: P = < 0.0001
Breed x Day: P = 0.12
HVBFA/TA x100%
(E)
Breed: P = 0.09
Day: P = 0.0001
Breed x Day: P = 0.22
HVBFA/DA x 100%
(F)
Breed: P = 0.01
Day: P = < 0.0001
Breed x Day: P = 0.007
DA/TA x 100%
Day 11
Day 15
ns
*
**
Days of ultrasound evaluations
Morada Nova
Santa Inês
Somalis Brasileira

Fig. 6

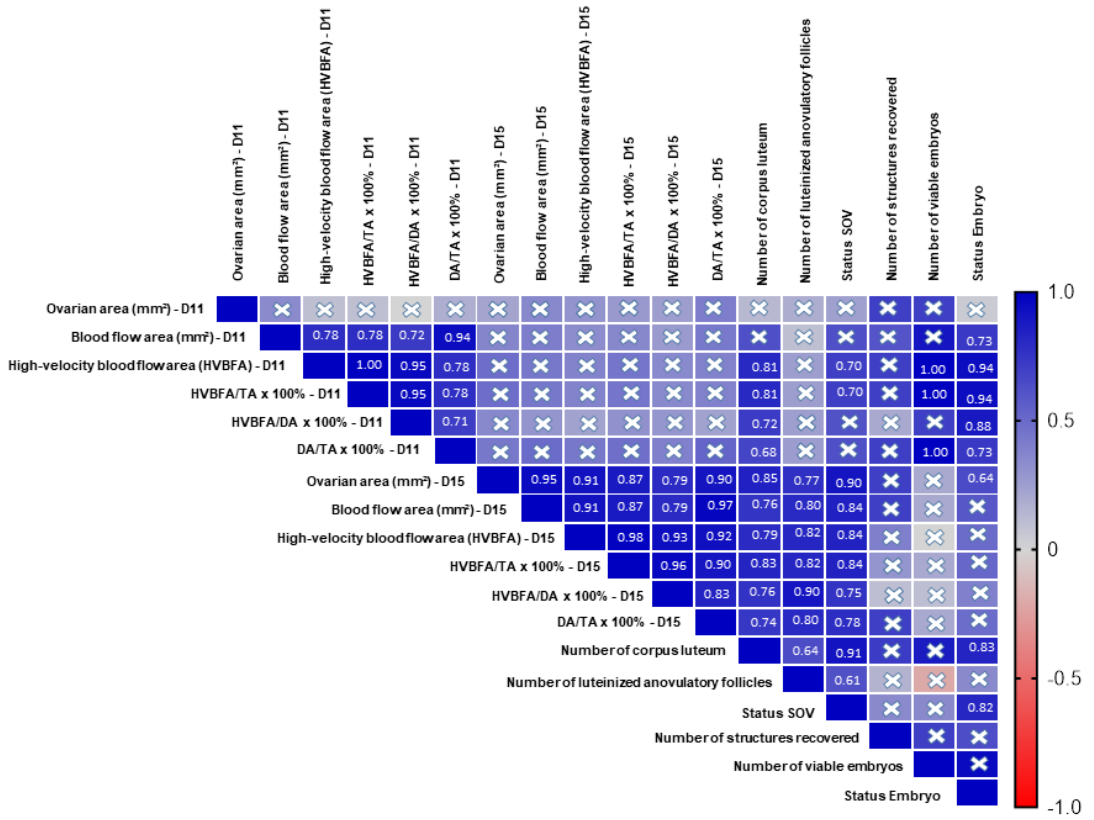

Ovarian area (mm³) - D11
Blood flow area (mm²) - D11
High-velocity blood flow area (HVBFA) - D11
HVBFA/TA x 100% - D11
HVBFA/DA x 100% - D11
DA/TA x 100% - D11
Ovarian area (mm³) - D15
Blood flow area (mm²) - D15
High-velocity blood flow area (HVBFA) - D15
HVBFA/TA x 100% - D15
HVBFA/DA x 100% - D15
DA/TA x 100% - D15
Number of corpus luteum
Number of luteinized anovulatory follicles
Status SOV
Number of structures recovered
Number of viable embryos
Status Embryo
1.0
0.5
0
-0.5
-1.0

Fig. 7

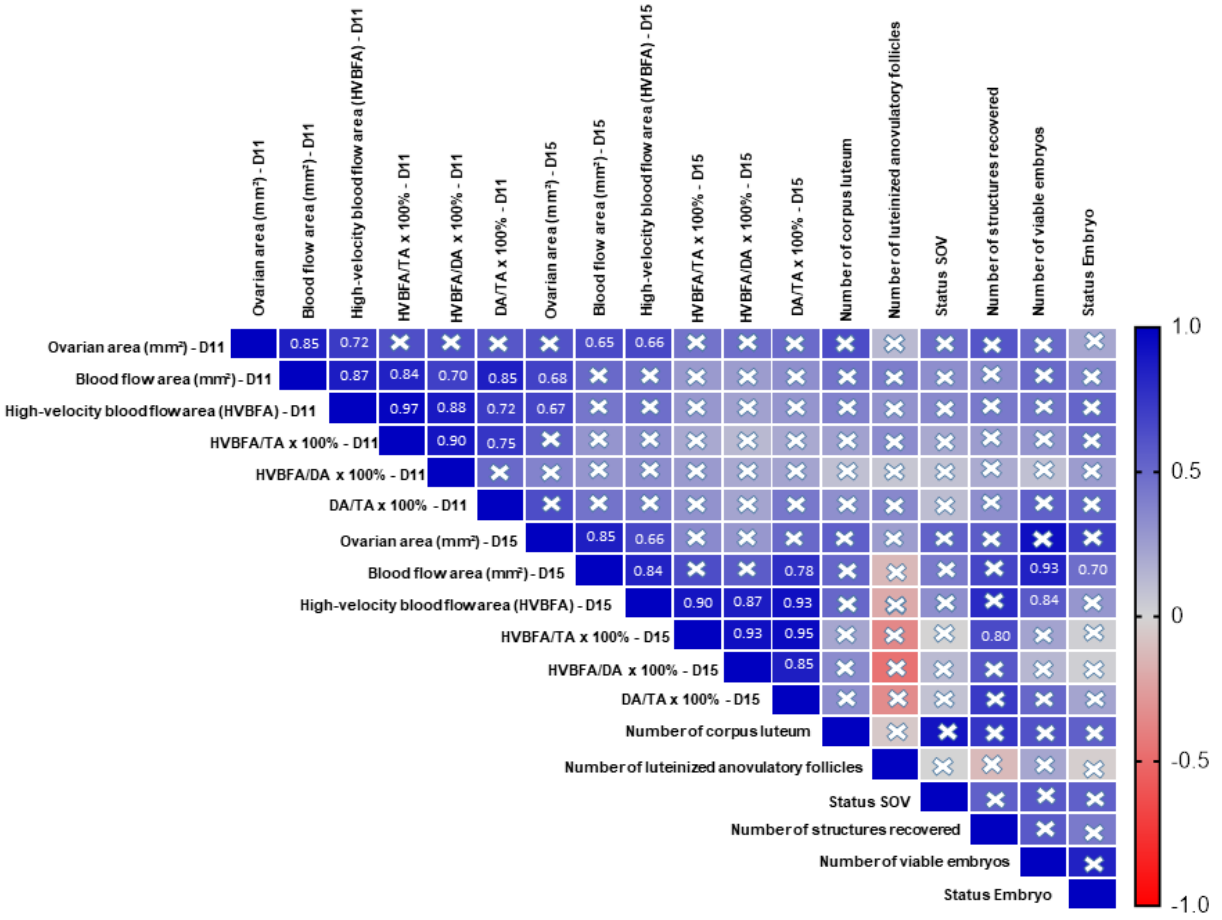
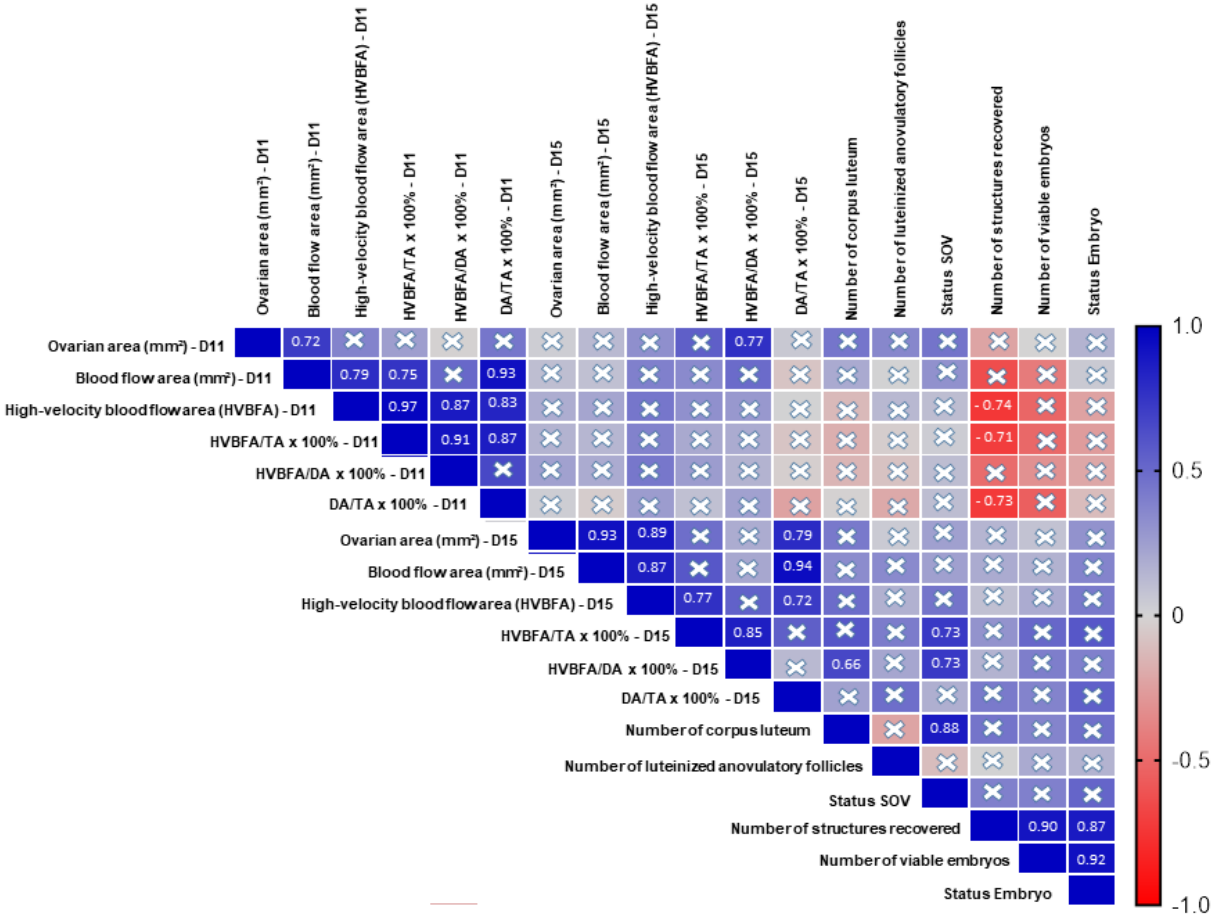

Ovarian area (mm²) - D11
Blood flow area (mm²) - D11
High-velocity blood flow area (HVBFA) - D11
HVBFA/TA x 100% - D11
HVBFA/DA x 100% - D11
DA/TA x 100% - D11
Ovarian area (mm²) - D15
Blood flow area (mm²) - D15
High-velocity blood flow area (HVBFA) - D15
HVBFA/TA x 100% - D15
HVBFA/DA x 100% - D15
DA/TA x 100% - D15
Number of corpus luteum
Number of luteinized anovulatory follicles
Status SOV
Number of structures recovered
Number of viable embryos
Status Embryo
1.0
0.5
0
-0.5
-1.0

Fig. 8


Ovarian area (mm³) - D11
Blood flow area (mm²) - D11
High-velocity blood flow area (HVBFA) - D11
HVBFA/TA x 100% - D11
HVBFA/DA x 100% - D11
DA/TA x 100% - D11
Ovarian area (mm³) - D15
Blood flow area (mm²) - D15
High-velocity blood flow area (HVBFA) - D15
HVBFA/TA x 100% - D15
HVBFA/DA x 100% - D15
DA/TA x 100% - D15
Number of corpus luteum
Number of luteinized anovulatory follicles
Status SOV
Number of structures recovered
Number of viable embryos
Status Embryo
1.0
0.5
0
-0.5
-1.0