

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/07/2021.

**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.

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

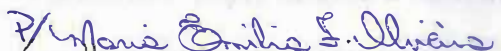
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



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

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



*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 **Jefferson 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/EG/L) 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 Ovinos (30 females), protocol number CEUA 2512100516, under the responsibility of **Jefferson 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/EG/L) 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 à 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 Lacau. 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 nulas. 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

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

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 múltiparas ($n = 10$ / 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 ($15,3 \pm 1,4$ e $2,4 \pm 0,2$), seguido pelas ovelhas Somalis Brasileira ($10,4 \pm 0,8$ e $1,5 \pm 0,2$) e então pelas ovelhas Morada Nova ($5,5 \pm 1,6$ e $0,8 \pm 0,3$). A área ovariana ($p = 0,02$), área de fluxo sanguíneo ($p = 0,05$) e porcentagem da área doppler ($p = 0,007$) 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 $\pm$ 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 $\pm$ 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 $\pm$ 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 $\pm$ 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. <i>Heatmap</i> 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 óocitos 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.

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. **Archives 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. et al. **Bioteecnologias 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. 1, 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-1B 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.