RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/06/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM OVELHAS SANTA INÊS EM FUNÇÃO DA DOSAGEM DE FSH

Giovanna Serpa Maciel
Médica Veterinária

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM OVELHAS SANTA INÊS EM FUNÇÃO DA DOSAGEM DE FSH

Giovanna Serpa Maciel

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano

Co-orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal.

2016

Maciel, Giovanna Serpa
M152r Resposta Superovulatória e produção *in vivo* de embriões em ovelhas Santa Inês / Giovanna Serpa Maciel. – – Jaboticabal, 2016
xv, 66 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira
Banca examinadora: Erika da Silva Carvalho Morani, Joaquim Mansano Garcia
Bibliografia

1. Dose FSH exógeno. 2. Superestimulação. 3. Ovino. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.621.9/646:636.37

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM OVELHAS SANTA INÊS EM FUNÇÃO DA DOSAGEM DE FSH

AUTORA: GIOVANNA SERPA MACIEL
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
CO-ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO
CO-ORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

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

Pesquisadora ERIKA DA SILVA CARVALHO MORANI
INPRENHA / Top in Life Biotecnologia e Genética Animal - Jaboticabal/SP

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de maio de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Giovanna Serpa Maciel – Nascida em Catanduva (SP), 05 de julho de 1990. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP, Campus de Jaboticabal (2013). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica, PIBIC/CNPQ (2010-2013). Atualmente, é mestranda do programa de Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP, Câmpus de Jaboticabal e bolsista FAPESP. Tem experiência na área de Ultrassonografia, Fisiologia Reprodutiva e Biotecnologias da Reprodução, com ênfase em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões e videolaparoscopia, atuando em Reprodução e Diagnóstico por Imagem em pequenos ruminantes.

“Toda ascensão exige esforço, adaptação e sacrifício.
Toda queda resulta em prejuízo, desencanto e recomeço.
Trabalha-te interiormente, vencendo limite e obstáculo, não considerando os terrenos vencidos, porém, fitando as paisagens ainda a percorrer.” (Joanna de Ângelis)

Dedico este estudo,

A Deus,

Meu marido,

Marcus,

Meus pais,

Hernando e Maria,

Meus irmãos,

Mirella e Hernando

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente em minha vida, mostrar que estou no caminho certo e por me inspirar em ser cada vez mais uma pessoa melhor; e aos **amigos espirituais** pela proteção e pelas energias positivas de cada dia.

Aos meus pais **Hernando** e **Maria** por me apoiarem em tudo que quis fazer em minha vida profissional, mesmo não concordando em tudo. Por acompanhar toda minha trajetória de pertinho, dando toda força para continuar lutando. Por todo carinho, amor, amizade de todos estes anos. Pai, você me inspira por ter superado todas as dificuldades que passou na vida e ter se tornado um homem admirável, culto, honesto e trabalhador. Mãe, você me inspira pela pessoa que é, por tudo que faz pelos três filhos e, mesmo diante das dificuldades da vida, sempre soube contorná-las tornado-se uma grande mulher e mãe. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Mirella** e **Hernando**, que me proporcionaram alegrias, companheirismo, amizade, amor, mas também discussões e tristezas que serviram para mostrar o quanto é ruim ficar longe de vocês. Amores da minha vida, tudo seria tão sem graça se vocês não existissem, mesmo sendo a filha do meio, a mais sofrida (brincadeira). Obrigada por fazerem parte da minha vida, por terem me ensinado tantas coisas e sempre me aconselharem. Ao meu cunhado, **Samuel,** que mesmo "pegando" no meu pé, é uma pessoa maravilhosa e que me ajudou e ajuda muito. Amo vocês.

Ao meu marido **Marcus**. É difícil agradecer tudo o que fez por mim em algumas palavras, mas vamos lá... pessoa especial e incrível que entrou em minha vida para que pudéssemos crescer juntos profissionalmente e pessoalmente. Admiro seu trabalho, esforço, inteligência, fé, caridade e, principalmente, por querer sempre me fazer feliz. Obrigada por aguentar meus momentos de ansiedade e de fortes emoções; você sempre sabe me tranquilizar. Agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida e por nos permitir de formar uma família. Te amo muito.

Aos meus avós, **Dirce** e **Silas**, que por onde quer que estejam estão olhando e orando por mim. A minha avó **Yvone**, por sempre participar de tudo na minha vida e sempre disposta a ajudar. Amo vocês.

À minha orientadora Professora **Maria Emilia Franco Oliveira,** por ter me aceitado como orientada, acreditado em meu potencial, pelos ensinamentos e por toda ajuda no projeto.

Ao meu co-orientador Professor **Wilter Ricardo Russiano Vicente**, pelos conselhos, ensinamentos, pela ajuda nos momentos mais difíceis e amizade.

À minha grande amiga **Mariana Garcia Kako Rodriguez** pela amizade, companheirismo, convívio e ajuda durante todo o experimento, pelos conselhos e por fazer parte da minha vida. O projeto não teria sido o mesmo sem você.

Aos meus amigos: **Marjury Maronezi, Victor Santos**, **Ricardo Ramirez**, **Ana Paula Simões**, **Priscila Silva**, **Dayane Vrisman**, **Juliane Trevizan, Ricardo Perecin**, **Felipe Barros**, **Renata Mariano**, **Rozana Rocha**, **Darcio Zangirolomi**, **Amanda Nonato**, **Marina Lima, Pedro Paulo Teixeira** que tanto se esforçaram e ajudaram durante o experimento; e aos **estagiários**: principalmente à **Isabella Ribeiro** e **Guilherme Campos**, que se dedicaram por tanto tempo ao projeto. Aos funcionários e amigos: **Edson Aguiar** e **Roberta Vantini** por terem colaborado durante o experimento.

À **Universidade Estadual Paulista – UNESP/FCAV** por permitir que meu estudo fosse realizado em uma Instituição renomada e contribuído para minha formação profissional, à **PROPE** (n° TC1288/2015) e à **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA** (n° 02.13.06.026.00.00) pelo auxílio financeiro do projeto, em especial, aos pesquisadores **Jeferson F. da Fonseca** e **Clara S. Oliveira** por terem contribuído com o projeto.

Agradeço à **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pela bolsa de mestrado concedida, processo n. 2014/04614-6

Enfim, a todas aquelas pessoas que contribuíram de alguma forma com este estudo.

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... xii
ABSTRACT xiii
LISTA DE ABREVIATURAS..... xiv
LISTA DE TABELAS..... xv

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais 16
1. Introdução 16
2. Revisão de Literatura 17
2.1. Ciclo Estral 17
2.2. Dinâmica Folicular 19
2.2.1. Ultrassonografia da Dinâmica Folicular 19
2.3 Superovulação em Ovelhas 21
3. Referências 25

CAPÍTULO 2 – Superovulação e produção *in vivo* de embriões em ovelhas Santa Inês com uso de diferentes doses de FSH..... 34
Resumo 34
Introdução 35
Material e Métodos 36
Resultados e Discussão 43
Conclusão 58
Referências 59

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 12062/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da dose de FSH na superestimulação gonadotrófica sobre a resposta superovulatória, funcionalidade de corpos lúteos e produção in vivo de embriões em ovelhas Santa Inês"**, sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª Maria Emilia Franco Oliveira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES EM OVELHAS SANTA INÊS EM FUNÇÃO DA DOSAGEM DE FSH

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da dose de FSH exógeno no tratamento gonadotrófico sobre a resposta superovulatória e produção *in vivo* de embriões em ovelhas. Vinte e quatro ovelhas Santa Inês foram submetidas à sincronização do estro com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) inserido no D0 e permaneceu até D8. Ao início do protocolo (D0) e na retirada do dispositivo intravaginal foram administrados 0,125 mg de análogo sintético da PGF2α (Sincrocio®). O tratamento gonadotrófico teve início 48 horas antes da retirada da progesterona (D6), quando as fêmeas foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais de acordo com a dose total de FSH suíno exógeno: G200 (n=8) - 200 mg; G133 (n=8) - 133 mg; e G100 (n=8) - 100 mg. As doses totais foram administradas em 8 aplicações à intervalos de 12 horas. No D6, as fêmeas receberam 300 UI de eCG. Foram realizadas ultrassonografias modo B e Doppler em cores, com o propósito de acompanhar o crescimento folicular da onda ovulatória, área de vascularização da parede folicular e o momento das ovulações. Seis dias após o início do estro, os embriões foram colhidos e avaliados morfologicamente e quanto ao percentual de células apoptóticas. Realizou-se teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunns, sendo que as taxas foram comparadas pelo teste do Chi-quadrado. A variável área da vascularização folicular foi comparada entre os tratamentos e momentos pela ANOVA com medidas repetidas no tempo e pós-teste de Tukey, com análises de correlação (Pearson) para o número de folículos e área da vascularização dos mesmos. O nível de significância utilizado para os testes estatísticos foi de 5% (P >0,05). A duração do estro nas ovelhas foi menor no G200 em relação ao G133 e semelhante ao G100 (P = 0,0218). O momento ovulatório ocorreu tardiamente no G200 (P = 0,0037); redução do tamanho do folículo pré-ovulatório e taxa de redução do tamanho do folículo pré-ovulatório foram maiores (P = 0,0027 e 0,0024, respectivamente) para ovelhas do G200 em relação ao G100, entretanto semelhantes ao G133. A área da vascularização folicular variou com relação aos momentos, aumentando gradativamente com pico entre as 216 e 232 horas e posteriormente decaiu (P < 0,001). A taxa de ovulação e falhas anovulatórias apresentaram diferença estatística entre os grupos (P = 0,016), o G100 apresentou maior valor da taxa de ovulação em relação ao G1333 e semelhante ao G200 e o G100 apresentou o menor valor das falhas anovulatórias em relação ao G133 e semelhante ao G200. O número de estruturas não fecundadas e a taxa de não fecundados foram maiores nos animais pertencentes ao G100 (P = 0,008 e 0,0477, respectivamente) em relação ao G200 e semelhante ao G133; o número de embriões viáveis e taxa de viabilidade foram maiores (P = 0,038 e 0,0493, respectivamente) para ovelhas do G200 em relação ao G133, entretanto semelhante ao G100; a porcentagem de células apoptóticas foi maior no grupo G100. Pôde–se concluir que a dose de 200 mg apresentou os melhores resultados das variáveis estudadas, não sendo assim indicado o uso de menores doses de FSH (100 mg e 133 mg) em tratamentos de superestimulação ovulatória em ovelhas Santa Inês.
Palavras-chave: dose FSH exógeno, superestimulação, ovino

SUPEROVULATORY RESPONSE AND IN VIVO PRODUCTION OF EMBRYOS IN SANTA INÊS EWES IN FUNCTION OF FSH DOSAGE

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the effect of exogenous FSH dose in gonadotropin treatment on superovulatory response and in vivo production of embryos in sheep. Twenty four Santa Inês ewes were submitted to synchronization of estrus with intravaginal progesterone device (CIDR®) inserted into D0 and remained until D8. At the start of the protocol (D0) and in the removal of the intravaginal device was administered 0.125 mg of PGF2a synthetic analog (Sincrocio®). The gonadotrophin treatment was initiated 48 hours prior to removal of progesterone (D6) when the females were randomly divided into three groups according to the total dose of exogenous porcine FSH: G200 (n = 8) - 200 mg; G133 (n = 8) - 133 mg; and G100 (n = 8) - 100 mg. The total doses been administered in 8 applications at intervals of 12 hours. On D6, the females received 300 IU eCG. Were performed B mode ultrasonography and color Doppler, in order to verify follicular growth of ovulatory wave, area of vascularization of the follicular wall and the moment of ovulation. Six days after the the onset of estrus, the embryos were collected and assessed morphologically and regarding the percentage of apoptotic cells. Was performed Kruskal Wallis test and Dunns post-test, and the rates were compared using Chi-square test. The variable area of the follicular vascularization was compared between treatments and moments by ANOVA with repeated measures in time and Tukey post-test, with correlation analysis (Pearson) for the number of follicles and area of the vascularization. The significance level used for the statistical tests was 5% (P> 0.05). The duration of estrus of sheep was lower in G200 compared to G133 and similar to G100 (P = 0.0218). The ovulatory moment occurred later in G200 (P = 0.0037); reduction of the size of the preovulatory follicle and rate of reduction of the size of preovulatory follicles were higher (P = 0.0027 and 0.0024, respectively) for sheep of the G200 compared to G100, though similar to G133. The area of the follicle vascularization varied with relation to moments, gradually increasing with a peak between 216 and 232 hours and then declined (P <0.001). The ovulation rate and anovulatory failures showed statistical differences between groups (P = 0.016), the G100 showed higher ovulation rate in relation to the G1333 and similar to G200 and the G100 showed the lowest value of anovulatory failures in relation to G133 and similar to G200. The number of non-fecundated structures and unfertilized rate were higher in animals pertaining to G100 (P = 0.008 and 0.0477, respectively) compared to the G200 and similar to G133; the number of viable embryos and viability rate was higher (P = 0.038 and 0.0493, respectively) for sheep of the G200 compared to G133, though similar to G100; the percentage of apoptotic cells was higher in the group G100. It was concluded that the dose of 200 mg showed the best results of the studied variables and is therefore not indicated the use of smaller doses of FSH (100 mg and 133 mg) in superstimulation ovulatory treatments in Santa Inês ewes.
Keywords: dose FSH exogenous, overstimulation, ovine

LISTA DE ABREVIATURAS

AVPF – área de vascularização da parede folicular

eCG – gonadotrofina coriônica equina

FSH – hormônio folículo estimulante

h – horas

hMG – gonadotrofina menopausal humana

LH – hormônio luteinizante

Mm – milímetro

mm/dia – milímetro por dia

MOTE – múltipla ovulação e transferência de embriões

PBS – Phosphate Buffered Saline

% – porcentagem

PGF2α – prostagladina $F_{2\alpha}$

RTFP – redução do tamanho do folículo pré-ovulatório

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios (± desvio padrão) de parâmetros obtidos para avaliação da manifestação do estro em ovelhas Santa Inês submetidas a distintos protocolos de superovulação..... 44

Tabela 2: Valores médios (± desvio padrão) de parâmetros foliculares obtidos por meio de avaliação da dinâmica folicular ovulatória de ovelhas Santa Inês submetidas a distintos protocolos de superovulação..... 46

Tabela 3: Valores médios (± desvio padrão) dos parâmetros obtidos para avaliação da resposta superovulatória de ovelhas Santa Inês submetidas a distintos protocolos de superovulação..... 52

Tabela 4: Valores médios (± desvio padrão) de parâmetros de estruturas não fecundadas e embriões obtidos de ovelhas Santa Inês submetidas a distintos protocolos de superovulação..... 58

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

A ovinocultura brasileira vem se destacando como alternativa de produção e rentabilidade para os produtores (Pacheco; Quirino, 2010). Tal cenário implica na busca constante de animais com alto desempenho reprodutivo e para isso faz-se necessário o desenvolvimento e correta aplicação das biotécnicas reprodutivas em ovinos. Entre essas, ressalta-se a inseminação artificial, sincronização e indução do estro e da ovulação, transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, diagnóstico precoce de prenhez, sexagem embrionária, clonagem de embriões e transgênese (Simplício et al., 2007).

Dentre estas biotecnologias, a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) é uma realidade singular em pequenos ruminantes. A MOTE tem como principal objetivo produzir um número maior de proles em um menor tempo, com notória qualidade para o plantel, aplicando-se técnicas que permitam maior produtividade de folículos, ovulação e embriões, concluindo com a transferência de embriões e maior taxa de nascimentos no rebanho ovino. Os dados nacionais, a respeito da transferência de embriões, não são devidamente divulgados, estimando-se que milhares de coletas, congelação e inovulações são realizados anualmente no Brasil. Sugere-se que a divulgação deste cenário pode inserir o Brasil entre as potências deste mercado, além de servir de parâmetro para pesquisadores e técnicos para prospecção de projetos e expansão do mercado (Fonseca et al., 2010).

A aplicação de tratamentos para superovulação das ovelhas, ou seja, o uso de técnicas de superestimulação ovariana se faz fundamental para que a MOTE tenha resultados consideráveis em pesquisas e no plantel ovino. Neste contexto, têm sido pesquisadas as melhores formulações de protocolos de superestimulação em ovelhas, os quais possam ser de custo acessível, com resultados satisfatórios e sem quaisquer efeitos deletérios para os embriões. O FSH, hormônio folículo estimulante, tem sido utilizado em tais tratamentos e as vantagens de sua aplicação nestes protocolos de superovulação para ovinos

aumentam o interesse de pesquisadores na adequação de doses efetivas e com menores efeitos não desejáveis.

Considerando as relevantes colocações supracitadas, este estudo tem como objetivo avaliar a dinâmica folicular ovulatória de ovelhas submetidas a diferentes protocolos hormonais de superovulação; estudar a área de vascularização da parede folicular por meio de ultrassonografia Doppler durante os tratamentos de superestimulação; confrontar a viabilidade dos protocolos hormonais de superovulação quanto às respostas superovulatórias e de produção *in vivo* de embriões; examinar indicativos de qualidade dos embriões produzidos por seus aspectos morfológicos e proporção de células apoptóticas. Ademais, hipotetiza – se que as menores doses terão resultados similares ou melhores que doses mais elevadas de FSH no uso dos protocolos de superestimulação ovariana em ovelhas.

4. Conclusão

A dose de 200 mg apresentou os melhores resultados das variáveis estudadas nas ovelhas Santa Inês superestimuladas, não sendo indicado o uso de menores doses de FSH (100 mg e 133 mg) em tratamentos de superestimulação ovulatória nestes animais, especialmente devido ao grande número de estruturas não fecundadas. Entretanto, é necessário ratificar que o uso da maior dose de FSH (200 mg) e as demais (100 e 133 mg) apresentaram grande variabilidade de resultados na maioria das variáveis estudadas (alto valor de desvio padrão).

A grande variabilidade dos resultados no mesmo grupo e entre os tratamentos (resposta ovariana e embrionária) na superovulação em ovelhas é ainda um fato comum e limitante na utilização da MOTE. São necessários mais estudos para maior

compreensão dos fenômenos da MOTE, visando resposta homogênea e adequada para as fêmeas nesta biotecnologia. Fato que possibilitará maior expansão dos programas de multipla ovulação e transferência de embriões com resultados satisfatórios em ovelhas.

5. Referências

[1] Oliveira MEF. State-of-the-art in the superovulation of ewes. Acta Scientiae Veterinariae 2011; 39:29–35.

[2] Fonseca JF. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia (GO). Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.1-9, 2005.

[3] Oliveira MEF. Dinâmica folicular no uso em protocolos de Sincronização de estro e superovulação em Ovelhas santa inês. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

[4] Amiridis GS, Cseh S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. Animal Reproduction Science 2012; 130:152–61.

[5] Quan F, Zhang Z, An Z, Hua S, Zhao X, Zhang Y. Multiple Factors Affecting Superovulation in Poll Dorset in China. Reproduction in Domestic Animals 2011; 46:39-44.

[6] Wu W, Yang M, Gong P, Wang F, Tian Y, Xu X, et al. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. African Journal of Biotechnology 2011; 10:15834-7.

[7] Gusmão AL. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. O Embrião 2005; 25:6-9.

[8] Oliveira MEF, Bartlewski PM, Feliciano MAR. Controle do ciclo estral. In: Oliveira MEF, Teixeira PPM, Vicente WRR, (Eds). Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos, São Paulo: MedVet; 2013, p. 71-89.

[9] Oliveira MEF, Feliciano MAR, D'amatoa CC, Oliveira LG, Sony D, Bicudo SD, et al. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. Animal Reproduction Science 2014; 144:20-37.

[10] Fonseca JF, Souza JMG, Bruschi JH. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG, 2007, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: UFMG, p.167-194, 2007.

[11] Kafi M, Mcgowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. Animal Reproduction Science 1997; 48:137–57.

[12] Bevers MM, Dieleman SJ, Blankestein DM, Van Tol HTM, Broek J. Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. Journal of Reproduction and Fertility 1989; 87:745–54.

[13] Oliveira MEF, Fonseca JF, Pieroni JSP, Ferreira RM, Cordeiro MF, Souza SF, et al. Occurrence of subnormal corpus luteum in superovulated Santa Inês sheep using protocols with or without LH administrated at the end of the FSH treatment. In: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2009, São Paulo. Anim Reprod 2009; 6:231-231.

[14] Loiola Filho JB, Monte APO, Souza TTS, Miranda MS, Magalhães LC, Barros CHSC, et al. Effect of pFSH dose reduction on *in vivo* embryo production in Dorper ewes. Semina: Ciências Agrárias 2015; 36:4215-24.

[15]Okada A, Kamada S, Jeon CW, Miyamoto A, Fukui Y. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. Journal of Reproduction and Development 2000; 46:397–402.

[16] Fonseca JF, Simplício AA. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. In: Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia, 2008, Belém (PA). Meio Ambiente e pecuária: Anais... Belém: FAEPA, Instituto Frutal, SEBRAE, PA, 21f, 2008.

[17] Oliveira MEF, Cordeiro MF, Ferreira RM, Souza SF, Pieroni JSP, Rodrigues LFS, et al. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation? Ciência Rural 2012; 42:1077-82.

[18] IETS. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. 3ª ed., Illinois Stringfellow, DA, Seidel SM, 180p, 1998.

[19] Bicudo SD, Azevedo HC, Maia MSS, Sousa DB, Rodello L. Aspectos Peculiares da Inseminação Artificial em Ovinos. Acta Scientiae Veterinariae 2005; 33:127-30.

[20] Oliveira, M.E.F.; Cordeiro, M.F.; Feliciano, M.A.R.; Oliveira, L.G. Fisiologia do ciclo estral. In: Oliveira, M.E.F.; Teixeira, P.P.M; Vicente, W.R.R. (Eds). Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos, São Paulo: MedVet; 2013, p. 17-24.

[21] Lima JTM. Efeito do protocolo de sincronização da onda folicular e do método de acasalamento sobre a produção de embriões em programas de superovulação de ovelhas da raça Santa Inês. 134f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária - UFF, Niterói, Rio de Janeiro, 2013.

[22] Nunes JF, Figueiró PRP. Fatores que afetam o comportamento reprodutivo em ovelhas corriedale e polwarth. Centro Ciências Rurais 1975; 5:301-6.

[23] Lamming GE, Mann GE. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2a production in cows by progesterone and oestradiol. Journal of Reproduction and Fertility 1995; 103:69-73.

[24] Almeida VM. Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de transferência de embriões correlacionados com o momento da ovulação em ovinos. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

[25] Oliveira MEF, Ayres H, Oliveira LG, Barros FFPC, Oba E, Bicudo SD et al. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in Santa Inês ewes under subtropical conditions, Theriogenology 2016; 85:452-60.

[26] Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R, 1997: The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen contentof follicular fluid: association with vascular enothelial growth factorlevels and perifollicular blood flow characteristics. Human Reproduction 1997; 12:1047–55.

[27] Van Blerkom J. Epigenetic influences in oocyte developmental com-petence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1998, 15;226–34.

[28] Clark AR, Stokes YM. Follicle structure influences the availabilityof oxygen to the oocyte in antral follicles. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2011;19.

[29] Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Almamun M, Beg MA, Ginther OJ. Relationship of vascular perfusion of the wall of the pre-ovulatory follicle to in vitro fertilization and embryo development inheifers. Reproduction 2009; 137:689–97.

[30] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. Reproduction 2003; 125:759-67.

[31] Lass A, Brinsden P. The role of ovarian volume in reproductivemedicine. Human Reproduction Update 1999; 3:256–66.

[32] Armstrong DT, Evans G. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology 1983; 19:31-42.

[33] Bungartz L, Niemman H. Assesssment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. Journal Reproduction and Fertility 1994; 01:583-91.

[34] Kohram H, Bousquet D, Durocher J, Guilbault L A. Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. Theriogenology 1995; 43;252-252.

[35] González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Groome NP, Garcia-Garcia RM, et al. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. Theriogenology 2002; 57:1263-72.

[36] Naqvi SMK, Maurya VP, Gulyani R, Joshi A, Mittal JP. The effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. Small Ruminant Research 2004; 55:57–63.

[37] Sejian V, Maurya VP, Kumar K, Naqvi SMK. Effect of Multiple Stresses (Thermal, Nutritional, and Walking Stress) on the Reproductive Performance of Malpura Ewes. Veterinary Medicine International 2012.

[38] Dobson H, Tebble JE, Phogat JB, Smith RF. Effect of transport on pulsatile and surge secretion of LH in ewes in the breeding season. Journal of Reproduction Fertility 1999; 116:1–8.

[39] Gusmão AL, Biscarde CEA, Kiya CK. Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2013; 37:226-31.

[40] Brebion P, Baril G, Cognié Y, Vallet JC. Transfert d´embryons chez les ovins et les caprins. Annales de Zootechnie 1992; 41:331-9.

[41] González-bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. Theriogenology 2000; 54:1055-64.

[42] Deshpande D, Ravindra JP, Narendranath R, Narayana K. Ovarian antral follicular dynamics and serum progesterone concentration during the oestrous cycle of Bannur ewes. Journal of Animal Science 1999; 69:932-4.

[43] Evans ACO. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. Animal Reproduction Science 2003; 78:289-306.

[44] Gibbons A, Pereyra-Bonnet F, Escobar L, Cueto M, 2010: Eficiencia de un tratamiento de ovulación múltiple con dosis reducida de FSHp en ovejas Merino. Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. InVet 2010; 12:268.

[45] Menezes DCR. Avaliação de protocolos para superovulação ovina. 85f. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

[46] Brasil OO, Moreira NH, Santos Júnior G, Silva BDM, Marianteb AS, Ramosb AF. Superovulatory and embryo yielding in sheep using increasedexposure time to progesterone associated with a GnRH agonist. Small Ruminant Research 2016; 136:54-8.

[47] Oliveira MEF, Oliveira CS, Lima MR, Barros FFPC, Perini AP, Feliciano MAR, et al. Use of active caspase 3 and tunel assays to estimate embryonic quality in *in vivo* santa ines ewe embryos. Reproduction, Fertility and Development 2014; 26:220-1.

[48] González-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Inskeep EK, et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. Reproduction Fertility and Development 2004; 16:421–35.

[49] Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrel B. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose, and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. Theriogenology 2000; 53:727–42.

[50] González-Bulnes A, Carrizosa JÁ, Díaz-Delfa C, Garcia-Garcia RM, Urrutia B, Santiago-Moreno J, et al. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. Small Ruminant Research 2003; 48:9-14.

[51] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 2000; 61:481-92.

[52] Wherman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17β-estradiol and increases conception in cows. Biology of Reproduction 1993; 49:214-20.

[53] Levya V, Buckrell BC, Walton JS. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. Theriogenology 1998; 50:395–416.

[54] González-bulnes A, Veiga-lopez A, Garcia P, Garcia-Garcia RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA, et al. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. Theriogenology 2005; 63:2523–34.

[55]Uribe-Velásquez LF, Cadavid RR., Osorio, JH. Respostas foliculares e endócrinas em ovelhas após sincronização do estro usando progesterona, prostaglandinas (PGF 2α) e gonadotrofinas. Veterinária e Zootecnia 2009; 3:14–27.