

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**SUPRESSÃO TEMPORÁRIA DO CRESCIMENTO FOLICULAR
OVARIANO EM OVELHA PELA ADMINISTRAÇÃO CONTINUADA
DE DESLORELINA NA FORMA INJETÁVEL OU IMPLANTE DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA**

LUIZ FERNANDO SALGADO SCAGION

BOTUCATU - SP

Junho/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**SUPRESSÃO TEMPORÁRIA DO CRESCIMENTO FOLICULAR
OVARIANO EM OVELHA PELA ADMINISTRAÇÃO CONTINUADA
DE DESLORELINA NA FORMA INJETÁVEL OU IMPLANTE DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA**

LUIZ FERNANDO SALGADO SCAGION

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da UNESP – Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal – Área de Concentração Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU - SP

Junho/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Scagion, Luiz Fernando Salgado.

Supressão temporária do crescimento folicular ovariano em ovelha pela administração continuada de deslorelina na forma injetável ou implante de liberação controlada / Luiz Fernando Salgado Scagion. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Capes: 50504002

1. Ovino - Reprodução. 2. Hormônios - Reprodução. 3. Biotecnologia animal.

Palavras-chave: Dinâmica folicular; Dowregulation; Hormônio liberador de gonadotrofina; Reprodução ovina.

Nome do Autor: **Luiz Fernando Salgado Scagion**

Título: SUPRESSÃO TEMPORÁRIA DO CRESCIMENTO FOLICULAR
OVARIANO EM OVELHA PELA ADMINISTRAÇÃO CONTINUADA DE
DESLORELINA NA FORMA INJETÁVEL OU IMPLANTE DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Presidente e Orientador.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
- Botucatu

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
– Botucatu

Prof Adj. André Luís Rios Rodrigues

Membro

Setor de Reprodução Animal Departamento de Patologia e Clínica Veterinária
Faculdade de Veterinária-Universidade Federal Fluminense.

Data da Defesa: 19 de Junho de 2015

Dedicatória

Aos meus pais, Wilson Luiz Scagion e Maria Luiza Galvão Salgado Scagion, sem eles esse sonho não seria possível, obrigado por toda dedicação e esforço realizado (que não foi pouco) em todo esse tempo. Vocês são minha força e inspiração. Amo Vocês.

A minha irmã Luciana Salgado Scagion, pelo companheirismo e confiança que somente irmãos são capazes de ter. Amo você.

Agradecimentos

A toda minha família que sempre me ajudou em toda minha formação.

Ao amigo, professor e orientador, Sony Dimas Bicudo, por toda ajuda e ensinamentos que foram além da parte acadêmica. Muito obrigado por em todo esse tempo ter confiado em minha competência, por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos.

A professora Eunice Oba pelas análises realizadas em seu laboratório.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal.

A empresa Ouro Fino pelos materiais cedidos que possibilitaram o projeto.

A empresa Virbac pelos materiais cedidos que possibilitaram o projeto.

A FMVZ-UNESP – Botucatu

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos durante todo o programa.

Ao Lucas Emanuel Ferreira Canuto por ter ajudado na realização de todo o experimento

Aos meus amigos e irmãos da república HM: Fabio Sossai Possebon, Thiago Guzella Guida, Bruno Massa de Viveiros, Luís Felipe Zucculo da Costa, por todo tempo que passamos juntos em nossa formação pessoal e profissional.

Aos meus amigos e irmãos que convivi durante todo esse tempo em Botucatu: Thiago Luiz Belém Spina, Renan Denadai, Luis Henrique Gomes, Rodrigo Barros, Veridiana Von Zuben, Fabiano Ricardo Campos Alves, Osvaldo Neto, Danuta Doiche, Felipe Agostinho, Isabella Agostinho, Fernanda C. Oliveira, Samadhi Gomes, Silvia Campos, Paula Bertoni, Luciana Souza, Felipe Guimarães, Selene Babboni. Não há solidão mais triste do que a do homem sem amizades.

Aos meus amigos e irmãos da minha cidade natal (Cerquilha).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das etapas experimentais.....	22
---	-----------

Figura 2 – A) Dispositivo de implante de deslorelina. 1) Seringa de aplicação, 2) Corpo do implante de 4,7mg e 3) Aplicador agulhado. B) Agulha 40x12 para comparação.....	24
---	-----------

Figura 3 - Número médio de folículos nos grupos experimentais G0 (Controle; n=5), G1 (Des 48h; n=6), G2 (Des 72h; n=5) e G3 (Implante; n=6), distribuídos nas classes pequenos (2 a 2,9 mm), médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) nos sete dias em que ocorreram os tratamentos em ovelhas Bergamácia.....	30/31
--	--------------

Figura 4 - Número médio e erro padrão do agrupamento de folículos médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) nos grupos G0 (Controle), G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante), distribuídos ao longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina em ovelhas Bergamácia.....	33
--	-----------

Figura 5 - Duração do ciclo estral, em dias (Média), das ovelhas divididas nos grupos G0 (Controle), G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante), os dias compreendem o tempo entre a ovulação ocorrida no protocolo de sincronização e a ovulação ocorrida após o término dos tratamentos.....	35
---	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Percentual de resposta (Total) das ovelhas Bergamácia (n=29) ao protocolo de sincronização pelo emprego do dispositivo intravaginal Eazi-Breed CIDR [®] , de segundo uso, por 12 dias e administração de 350UI de eCG.	29
---	-----------

TABELA 2 - Resposta ovariana, após início dos tratamentos com acetato de deslorelina durante e após 48 horas nos grupos, G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) em relação às ovulações, luteinizações e atresias ocorrida nos folículos de ovelhas Bergamácia atribuídas ao efeito do fármaco.	34
--	-----------

TABELA 3 - Tempo médio $\pm$ desvio padrão em dias nos grupos G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) para a Supressão dos folículos médios e grandes e o tempo do retorno do crescimento folicular após a interrupção do tratamento com acetado de deslorelina.	34
--	-----------

TABELA 4 - Tempo médio $\pm$ desvio padrão em dias dos grupos G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) para ocorrência das ovulações (Ovulação relacionada com retorno do crescimento folicular e ovulação relacionada com a interrupção do tratamento).	35
---	-----------

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	Xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. <i>Ciclo estral</i>	2
2.2. <i>Interações entre o folículo e o oócito</i>	7
2.3. <i>Foliculogênese</i>	8
2.4. <i>Dinâmica folicular</i>	12
2.5. <i>Downregulation</i>	14
2.6. <i>Acetato de deslorelina</i>	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. <i>Local de experimentação e manutenção dos animais</i>	19
4.2. <i>Delineamento experimental</i>	20
4.2.1. <i>Cronologia e etapas experimentais</i>	20
4.2.2. <i>Grupos experimentais</i>	21
4.3. <i>Metodologias</i>	23
4.3.1. <i>Administração continuada de deslorelina Injetável</i>	23
4.3.2 <i>Aplicação e remoção dos implantes</i>	23
4.3.3. <i>Deteção do comportamento estral</i>	24
4.3.4. <i>Acompanhamento da atividade ovariana</i>	24
1 - <i>Procedimentos</i>	24
2- <i>Crêterios utilizados na avaliação ultrassonográfica</i>	25
3 - <i>Momentos das avaliações da atividade ovariana</i>	27
4.3.5. <i>Confirmação da funcionalidade do corpo lúteo</i>	27
4.4. <i>Análise estatística</i>	28
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	41

8. REFERÊNCIAS.....	42
9. TEXTO CIENTÍFICO.....	55
ANEXOS.....	70

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

RESUMO

Objetivou-se estudar comparativamente os efeitos da administração seriada de 100µg de deslorelina por via intramuscular frente ao implante de liberação continuada de deslorelina (4,7mg), sobre a supressão temporária do crescimento folicular ovariano em ovelhas Bergamácia, visando a aplicação em biotecnologias do controle da ovulação. Após um período de adaptação e monitoramento da ciclicidade, as ovelhas tiveram o estro sincronizado pelo emprego de dispositivo intravaginal Eazi-Breed CIDR[®], (0,33g de progesterona) de segundo uso, por 12 dias e administração única, pela via intramuscular, de 350UI de eCG concomitantemente à retirada do dispositivo. Foram coletadas amostras de sangue para confirmação da ovulação e ciclicidade através da quantificação de progesterona no plasma sendo considerados animais com atividade lútea aqueles que apresentaram valores igual ou superior a 1ng/mL. Decorridos seis dias da ovulação, as fêmeas foram então divididas em quatro grupos: G0 (Controle): animais sem tratamento; G1 (DES 48h): animais submetidos a aplicações intramusculares de 100µg de deslorelina a cada 48 horas durante sete dias; G2 (DES 72h): animais submetidos a aplicações intramusculares de 100µg de deslorelina a cada 72 horas durante sete dias; e G3 (Implante): animais com implante subcutâneo contendo 4,7mg de deslorelina que permaneceu por sete dias. Durante o período de tratamento específico de cada um dos grupos (sete dias), os animais tiveram os ovários monitorados ultrassonograficamente uma vez ao dia para a constatação da supressão do crescimento folicular, sendo os folículos presentes nos ovários classificados em pequenos, com diâmetro de 2 a 2,9mm, médios, com diâmetro de 3 a 4,4mm e grandes, com diâmetro $\geq 4,5$ mm. O monitoramento ultrassonográfico ovariano foi mantido após o término dos tratamentos, até que 100% das ovelhas retomassem a atividade de crescimento folicular. A população folicular foi comparada por classe do mesmo grupo e entre os grupos durante o período de tratamento com deslorelina. O G0 (Controle) não apresentou

diferença ($p>0,05$) entre as classes de folículos sendo que o tempo decorrido pós-sincronização não permitiu caracterizar o típico padrão em onda de crescimento folicular. O G1 (DES 48h) não apresentou diferença ($p>0,05$) na classe de folículos pequenos e para a classe de folículos médios, houve diferença ($p<0,05$) ao longo do tratamento a partir do D6 em relação ao D0 e para a classe de folículos grandes houve diferença ($p<0,05$) no D2 em relação aos demais dias. Para G2 (DES 72h) não houve diferença ($p>0,05$) nas classes de folículos pequenos, médios e grandes. Para o G3 (Implante), na classe de folículos médios ocorreu diferença ($p<0,05$) no D3 e no D7, sem que houvesse diferença ($p>0,05$) para a classe folículos pequenos e grandes ao longo do tratamento. Comparando a classe de folículos médios entre os grupos foi encontrada diferença ($p<0,05$) entre o G0 (Controle) com os demais grupos a partir do D6. Comparando a classe de folículos grandes encontrou-se diferença ($p<0,05$) entre o G0 (Controle) e o G1(DES 48h) somente no D4 ($0,83 \pm 0,75$ vs 0 ± 0), entre o G0 (Controle) e o G2 (DES 72h) somente no D4 ($0,83 \pm 0,75$ vs 0 ± 0) e entre o G0 (Controle) e o G3 (Implante) não existiu diferença ($p>0,05$). Quando somada a população de folículos médios e grandes o G1(DES 48h) difere entre os dias do D6 em diante e em relação ao D0 e em relação ao G0 (Controle) do D4 em diante e o G2 (DES 72h) e G3 (Implante) difere do G0 (Controle) do D5 em diante. Em todos os tratamentos a deslorelina exerceu efeito de supressão temporária de crescimento folicular não havendo influência da forma de administração ($p>0,05$) sobre o tempo de retorno da atividade ovariana, que em média ocorreu com 12 dias.

Palavras chaves: Dinâmica folicular, hormônio liberador de gonadotrofina, *dowregulation*, reprodução ovina.

Scagion, L.F.S. Temporary suppression of ovarian follicular growth in ewe by continued administration of deslorelin in injectable form or controlled release implant. Botucatu, 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The objective is to comparatively study the 100µg deslorelin serial administration effects front implantation of sustained release deslorelin (4.7 mg) on the temporary suppression of ovarian follicular growth in Bergamacia ewe aiming the application in biotechnology for the control of ovulation. After an adaptation period and monitoring of cyclicity, they had estrus synchronized with the second use intravaginal device Eazi-Breed CIDR® (0.33g progesterone) for 12 days and a single intramuscular injection, of eCG 350UI concurrently with the removal of the device. Blood samples were collected for confirmation of ovulation and cyclicity by measuring plasma progesterone being considered with luteal activity those animals with values equal or higher than 1 ng / mL. Elapsed six days of ovulation females was then be randomly divided into four groups: G0 (Control): untreated animals; G1 (DES 48h); animals subjected to intramuscular injections of 100µg deslorelin every 48 hours for seven days; G2 (DES 72h) animals subjected to intramuscular injections of 100µg deslorelin every 72 hours for seven days; and G3 (implant): animals with subcutaneous implant containing 4.7 mg deslorelin that remained for seven days. During the specific treatment period of each group (seven days), the animals ovaries was monitored by ultrasound to establish the suppression of follicular growth. And the follicles present in the ovaries classified into small, with a diameter of 2 to 2.9 mm, medium, with a diameter of 3 to 4.4 mm and large diameter ≥ 4.5 mm. Ovarian ultrasound monitoring was maintained after completion of treatment, until 100% of the sheep retake the follicular activity. The follicular population was compared in the groups and between the groups during the treatment period. The G0 (Control) did not differ ($p > 0.05$) between the follicles classes wherein the post-synchronization elapsed time did not allow to characterize the typical pattern in follicular wave. The Group G1 (DES 48h) did not differ in the class of small follicles and in the class of medium follicles have significant differences ($p < 0.05$) between days from D6 of treatment in relation to D0 and in the class of large follicles have significant differences ($p < 0.05$) on D2. For G2 (DES 72h) there is no significant difference ($p > 0.05$) in the classes of small, medium and large follicles. For the Group G3 (implant), in the class of médium follicles have significant differences ($p < 0.05$) in the D3 and D7, and in the class of large and small follicles there is no significant difference ($p > 0.05$) between days. Comparing the class of medium follicles between groups we found significant difference ($p < 0.05$) between G0(Control) and the other gruops from D6 onwards. Comparing the class of large follicles between groups we found

significant difference ($p < 0.05$) between G0 (Control) and G1 (DES 48h) on D4, between Group G0 (Control) and G2 (DES 72h) on D4, and between G0 (Control) and G3 (Implant) there is no significant difference ($p > 0.05$). When coupled population of medium and large follicles G1 (DES 48h) differs between days on D6 relative to D0 and relative to G0 (Control) on D4, G2 (DES 72h) and G3 (Implant) differs from G0 (Control) on D5. In all subgroups the deslorelin played the suppression of follicular growth and there is no influence of the form of administration ($p > 0.05$) on the turnaround time of ovarian activity, which on average was 12 days.

Keywords: Follicular dynamics, gonadotropin-releasing hormone, downregulation, sheep reproduction.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura mundial vem-se intensificando nos últimos anos, sobretudo nos países menos desenvolvidos devido ao grande potencial econômico. No Brasil é uma atividade em pleno desenvolvimento, confirmado pelo interesse dos criadores pela espécie e do mercado consumidor pelos seus produtos. É a atividade pecuária que apresenta maior crescimento, este associado às condições econômicas, sociais e ambientais favoráveis. Segundo dados do IBGE, houve um aumento de 1,62% do rebanho ovino entre os anos de 2010 e 2011, passando então a 17,6 milhões de cabeças.

No Estado de São Paulo, a ovinocultura desponta-se como atividade importante no contexto econômico, contando com um excelente sistema de apoio técnico, representado pela Associação Paulista dos Criadores de Ovinos (ASPACO), com cerca de 240.000 cabeças em 200 rebanhos cadastrados.

Tendo em vista o aumento da produtividade e o incremento nos ganhos na ovinocultura moderna, precisamos aliar ao melhoramento genético a utilização de biotécnicas da reprodução como a sincronização do estro, inseminação artificial e a transferência de embriões.

Uma limitação para o desenvolvimento de programas de superovulação e transferência de embrião em ovinos e caprinos é a grande variação na resposta do ovário aos estímulos das gonadotrofinas nos tratamentos tradicionais. Isto ocorre porque nem sempre é levado em conta o status de desenvolvimento folicular no início do protocolo de superestimulação (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Resultados mais regulares são obtidos ao iniciar o tratamento na ausência de folículos dominantes (Gharbi et al., 2012).

25 Este trabalho teve como intuito estudar formas de controle da atividade de
26 crescimento folicular ovariano da ovelha, pela administração continuada de
27 deslorelina, na forma injetável ou implante subcutâneo de liberação controlada,
28 hipotizando que haja supressão do crescimento folicular de maneira reversível.

29 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

30 *2.1. Ciclo estral*

31 O ciclo estral é um conjunto de eventos que se repetem sucessivamente.
32 Nas ovelhas o ciclo estral tem uma duração de 17 ± 2 dias. Sendo o estro
33 iniciado no dia zero, os demais dias podem ser divididos em duas fases: fase
34 luteal, que se estende desde o dia 2 até o dia 13 e a fase folicular, que
35 compreende do dia 14 até o dia 1 do ciclo seguinte (RUBIANES, 2000).

36 Quanto à distribuição anual dos estros, a ovelha é classificada como
37 poliéstrica estacional (FONSECA, 2005) e a duração da estação sexual varia
38 de acordo com a extensão do dia, da raça, do estado nutricional e alimentação.
39 Esta estacionalidade é governada pelo fotoperiodismo com a atividade estral
40 começando durante o período em que diminui a duração circadiana da
41 luminosidade. Nas zonas tropicais, onde a variação anual do fotoperíodo é
42 menor, a tendência dos ovinos e caprinos locais é ciclar durante o ano todo
43 (JAINNUDEN et al., 2004).

44 A relação entre a exposição à luminosidade e o sistema gerador de
45 pulsos de LH em ovinos, é bem estudada. O fotoperíodo é formado por um
46 caminho complexo que envolve passos neurais e humorais. Os sinais
47 luminosos são captados pelos fotorreceptores dos olhos, transmitidos pelo
48 sistema nervoso monossináptico para o hipotálamo e depois à glândula pineal.
49 Esta converte o sinal nervoso em supressão da liberação hormonal, o qual

50 apresenta característica de um ritmo circadiano de secreção de melatonina
51 (SÁ, 2002).

52 A duração da secreção de melatonina é diretamente proporcional ao
53 comprimento da exposição do animal à obscuridade da noite, quando ocorre
54 sua produção. Portanto, na presença da luz, a secreção é inibida. Existe um
55 ciclo circadiano de liberação que em condições normais coincide com o ciclo
56 luz-obscuridade, podendo ser interpretado como indutivo ou supressivo. Os
57 sinais de melatonina indutiva estimulam o pulso gerador de LH enquanto que o
58 supressivo inibe este pulso (KARSCH, 1984).

59 Mudanças significantes na liberação de GnRH são induzidas com
60 tratamentos com melatonina. Em ovelhas ovariectomizadas e com implante de
61 estradiol 17 β , a frequência de liberação de GnRH e LH está reduzida durante o
62 anestro ou em dias longos (GOODMAN et al., 1982) com pulso a cada 6 horas.
63 Ao ser inserido um implante de melatonina ocorre um aumento dramático na
64 frequência dos pulsos de GnRH e LH, passando a 10 pulsos a cada 6 horas
65 (VINGUIE et al., 1995).

66 Então a estação reprodutiva concentra-se nos meses de menor exposição
67 à luz ao longo do ano, o que não quer dizer que nos demais períodos não
68 ocorram atividade ovariana (EVANS & MAXWELL, 1990).

69 Em estudo utilizando a ultrassonografia em tempo real, associada a
70 quantificações hormonais na observação de ovelhas em anestro, observou-se
71 desenvolvimento folicular sem a ocorrência de pico ovulatório de LH. Foram
72 observadas oscilações nas concentrações de estrógenos e progesterona,

73 devido ao desenvolvimento folicular e ocorrência de luteinização de folículos
74 (BARTLEWSKI et al., 1998).

75 A ausência de estro e ovulação na ovelha é resultado de uma mudança
76 no mecanismo de controle retrógrado ao estradiol, mediado pelo fotoperíodo. A
77 inter-relação entre o eixo hipotálamo-hipófise e o estrógeno secretado pelo
78 folículo em crescimento será predominantemente negativa (McNEILLY et al.,
79 1986).

80 Próximo ao final da estação de anestro, a secreção de LH é
81 restabelecida, devido a maior prevalência de liberação de melatonina que
82 então exerce modulação dos mecanismos inibitórios que mantinham a
83 frequência e amplitude dos pulsos de LH em declínio, estimulando a produção
84 de estrógeno dos folículos ovarianos, com retorno do pico pré-ovulatório de LH
85 (KARSCH et al., 1984).

86 A alta temperatura ambiental e a falta de alimentos podem restringir a
87 atividade sexual durante alguns meses do ano nos trópicos, porém, logo após o
88 início da estação chuvosa, essa atividade aumenta (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

89 O genótipo influencia na estação sexual, uma vez que as raças de ovinos
90 originadas próximo ao equador, como Dorset, Merino e Rambouillet,
91 apresentam estações sexuais mais longas do que as raças britânicas como
92 Southdown, Shropshire e Hampshire, mantidas no mesmo ambiente (HAFEZ &
93 HAFEZ, 2004).

94 O cio das ovelhas perdura de 24 a 36 horas em média. A raça, idade,
95 estação e presença do macho influem na duração do cio. Raças de lã
96 apresentam períodos de cio mais longos do que as raças de corte. O cio é de

97 duração mais curta no início e no fim da estação de monta, na presença do
98 macho e na primeira estação de monta de fêmeas jovens. A ovulação é
99 espontânea e ocorre normalmente cerca de 24 a 27 horas após o seu início.

100 Em muitas raças, pode ocorrer uma ou mais ovulações durante o cio. A
101 taxa de ovulação é de 1,2 para ovelhas Merino e de 3 para a raça Finnish
102 Landrace. A taxa de ovulação aumenta com a idade e atinge o máximo dos 3
103 aos 6 anos, declinando gradualmente após essa faixa etária. No ovário direito
104 ocorre um número significativamente maior de ovulações (53,4%) do que no
105 ovário esquerdo (46,6%) (JAINNUDEN et al., 2004). A luteólise usualmente
106 ocorre no dia 14 ou 15 do ciclo estral (SCARAMUZZI et al., 1993).

107 O controle do ciclo estral dá-se por uma inter-relação entre os hormônios
108 produzidos no hipotálamo, o GnRH; hipófise, o LH e FSH; folículo, o estradiol e
109 a inibina; corpo lúteo (CL), a progesterona e a ocitocina e útero, a
110 prostaglandina $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SCARAMUZZI et al., 2011).

111 Essas inter-relações têm sido extensivamente estudadas na ovelha, de
112 modo que a sequência de eventos endócrinos, controle do ciclo estral,
113 ovulação e o estabelecimento da gestação foram bem documentados
114 (SCARAMUZZI et al., 1993; SCARAMUZZI et al., 2011; McNEILLY et al., 1991;
115 BAIRD & McNEILLY et al., 1981)

116 A liberação do GnRH pelo hipotálamo leva à um estímulo positivo para a
117 produção de LH e FSH pela hipófise anterior e estas gonadotrofinas estimulam
118 o desenvolvimento folicular (McNEILLY et al., 1991).

119 No ovário ocorre um aumento na produção de estradiol estimulado por um
120 aumento na frequência de pulsos de GnRH e LH devido a queda na

121 concentração de progesterona durante a regressão luteal, com isso através do
122 controle retrógrado positivo promovido pelo estradiol tem-se a ocorrência do
123 pico pré-ovulatório de LH. Em contraste, a concentração de FSH diminui
124 suprimida pela secreção crescente de estradiol e inibina do folículo pré-
125 ovulatório (BAIRD & McNEILLY et al., 1981)

126 O primeiro sinal para o pico pré-ovulatório de GnRH e LH, segundo
127 SCARAMUZZI (1993), é o aumento da secreção de estradiol e que também é
128 responsável pelas manifestações de estro.

129 O pico pré-ovulatório de LH, é responsável pela ovulação e pela
130 luteinização do folículo, e subsequente formação do CL. Após ovulação, o CL
131 formado secreta progesterona que inibe a secreção uterina do hormônio
132 prostaglandina durante os primeiros dias da fase luteal e suprime a frequência
133 de pulsos do hormônio GnRH, controlando a secreção tônica de LH (FLINT et
134 al., 1989; BAZER et al., 1991).

135 No hipotálamo e hipófise, a progesterona promove a inibição da
136 pulsabilidade de GnRH, e subsequente pico de LH. A diminuição na
137 frequência dos pulsos de GnRH é de grande importância para que as células
138 gonadotróficas hipofisárias forme estoque de FSH necessário para ativar o
139 recrutamento de novos folículos (CHABBERT-BUFFER et al., 2000)

140 Enquanto os níveis de LH e esteroides estão baixos, há uma elevação
141 significativa na concentração de FSH um dia após a ovulação seguido por um
142 aumento na secreção de estradiol por um *pool* de novos folículos antrais
143 (SOUZA et al., 1998).

144 Entre os dias 11 e 12 do ciclo, inicia-se o mecanismo de retroalimentação
145 positivo ocitocina luteal – PGF_{2α} endometrial, que culmina com a lise do corpo
146 lúteo. Isso leva a uma queda brusca da progesterona plasmática por volta do
147 dia 13 (BAIRD & McNEILLY, 1981). A ocitocina desempenha um papel central
148 nesse processo. A ocitocina proveniente da neuro-hipófise estimula a secreção
149 de PGF_{2α} do endométrio. A PGF_{2α} estimula a secreção de ocitocina do CL, e a
150 ocitocina luteínica amplia a produção de PGF_{2α} do útero, caracterizando o
151 processo de retroalimentação positiva. Nesse momento, a luteólise tem início
152 como resultado da elevação e ativação de receptores de estradiol, aumentando
153 o número de receptores de ocitocina no endométrio, iniciando o mecanismo de
154 retroalimentação descrito (HOOPER et al., 1986).

155 2.2. Interações entre o folículo e o oócito

156 É sabido que a oogênese e a foliculogênese estão intimamente ligadas ao
157 crescimento e desenvolvimento do oócito em uma relação com as células
158 somáticas do folículo (THIBAULT 1977).

159 A perspectiva tradicional da relação entre o oócito e o folículo sempre foi
160 de que o oócito era passivo e seu crescimento e desenvolvimento eram ditados
161 pelo sistema endócrino e pelas células somáticas dos folículos. Porém, agora
162 sabemos que o oócito não é totalmente passivo no processo da foliculogênese,
163 mas que tem um papel ativo e essencial (SCARAMUZZI et al., 2011)
164 secretando fatores de crescimento e regulando a foliculogênese (GILCHRIST
165 et al., 2004; MCNATTY et al., 2004).

166 Estes fatores atuam em importantes funções das células da granulosa e
167 das células do *cumulus*, como: crescimento celular, aumento da sobrevivência

168 celular, modulação da esteroidogênese e expansão e metabolismo das células
169 do *cumulus* (EPPIG 2001; GILCHRIST et al. 2004).

170 Segundo Li e colaboradores (2000), o oócito modula a síntese de
171 estrógeno e progesterona pelas células murais e do *cumulus*.

172 O oócito tem maior capacidade em regular todos estes fatores durante a
173 fase da foliculogênese dos folículos dependentes das gonodotrofinas, após
174 completar a fase de seu crescimento (GILCHRIST et al., 2008).

175 Então, a comunicação entre o oócito e as células da granulosa é
176 essencial para o crescimento e desenvolvimento normais, tanto do folículo
177 como do oócito, e essa comunicação ocorre por via parácrina e através de *gap-*
178 *junction* (GILCHRIST et al., 2004)

179 Os principais fatores de crescimento expressados pelo oócito que
180 regulara a foliculogênese são: fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9)
181 e a proteína morfogenética do osso 15 (BMP 15) também conhecido como
182 GDF-9b (DONG et al., 1996). Os dois são membros da família dos TGF- β e as
183 células da granulosa e do *cumulus* expressam uma grande quantidade desses
184 receptores (MCNATTY et al., 2005).

185 2.3. Foliculogênese

186 A foliculogênese é o processo de desenvolvimento e crescimento folicular
187 (SCARAMUZZI et al., 1993). O início da foliculogênese em fêmeas mamíferas
188 ocorre na fase fetal, especificamente nos ovinos, ocorre logo após a
189 diferenciação sexual, aproximadamente 35 dias após a concepção
190 (SCARAMUZZI et al., 2011), quando as células germinativas primordiais
191 migram do saco vitelino para a gônada em formação, originando as oogônias.
192 Estas diferenciam-se em oócitos, os quais, associados a uma camada de

193 células epiteliais, constituem os folículos primordiais (SOTO-SUAZO & ZORN,
194 2005; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

195 No processo de foliculogênese, o folículo leva ao redor de 180 dias para
196 atingir o estágio pré-ovulatório, sendo 135 dias até o aparecimento do antro, e
197 mais de 45 dias até a ovulação (CAHILL et al., 1979).

198 Scaramuzzi e colaboradores (1993) propuseram um modelo geral para a
199 foliculogênese desde o estágio primordial até o folículo ovulatório em ovelhas,
200 baseado na inter-relação do folículo com as gonadotrofinas.

201 O crescimento dos folículos primordiais até primários aparentemente
202 independe de gonadotrofinas, apresentam baixa taxa de atresia, e são
203 chamados de folículos independentes de gonadotrofinas (SCARAMUZZI et al.,
204 2011). O ovário de ovelhas jovens contém cerca de 300.000 folículos
205 primordiais (CAHILL et al., 1979; MARIANA et al., 1991). Cada um destes
206 folículos primordiais contém um oócito que é desprovido de zona pelúcida, mas
207 está envolto por uma camada de células epiteliais (SCARAMUZZI et al., 1993).
208 Esses folículos possuem inúmeros receptores para fatores de crescimento, por
209 exemplo: c-kit, *kit ligand* e GDF9, e esses fatores de crescimento estão
210 envolvidos positivamente e negativamente na iniciação do crescimento folicular
211 (SCARAMUZZI et al., 2011).

212 Em um estudo feito *in vitro* com ovários bovinos e humanos, mostrou-se
213 que a maioria dos folículos primordiais foi ativada após poucos dias de seu
214 isolamento do ovário, sugerindo que esses fatores inibitórios podem ser
215 importantes para controlar a saída desses folículos do estágio primordial
216 (FORTUNE, 2003).

217 Uma vez que os folículos deixam o “pool” de folículos primordiais, tornam-
218 se folículos primários por volta dos 100 dias da vida fetal nos ovinos, com
219 crescimento independente de gonadotrofinas. Os primeiros eventos que podem
220 ser detectados nessa fase são: síntese de RNA pelo oócito, aumento do oócito,
221 atividade mitótica nas células da granulosa que se tornam cuboides e formação
222 da zona pelúcida (LUNDY et al., 1999). Conforme esses folículos se
223 desenvolvem, ocorre a formação da teca interna (2-3 camadas de células da
224 granulosa) que possui receptores para LH e passam a ser chamados de
225 folículos pré-antrais (SCARAMUZZI et al., 2011). Na ovelha, esses folículos
226 possuem aproximadamente 100.000 células da granulosa e podem existir
227 cerca de 4.000 destes folículos em uma única onda (CAHILL et al., 1979).

228 Segundo McNatty e colaboradores (1992) folículos acima de 1 mm de
229 diâmetro são responsivos ao FSH e podem ser descritos como folículos
230 responsivos às gonadotrofinas. No início do estágio de crescimento, são
231 necessários receptores de FSH na célula da granulosa. Nesta fase encontram-
232 se desde folículos pré-antrais até folículos antrais pequenos (1mm de diâmetro
233 à 2,5 mm) com diferentes respostas às gonadotrofinas (McNATTY et al., 1992;
234 SCARAMUZZI et al., 1993) e células da granulosa que sintetizam e secretam
235 proteoglicanos em resposta ao FSH. Estes envolvidos na formação do antro e
236 diminuem a atividade mitótica dessas células (AX & RYAN, 1979).

237 Em ovelhas, folículos antrais maiores que 2 e 3 mm de diâmetro são
238 absolutamente dependentes de gonadotrofinas, e são destes folículos que
239 ocorre o recrutamento e a seleção de folículos capazes de ovular. Para um
240 folículo mudar de responsivo às gonadotrofinas para dependente de
241 gonadotrofinas e crescer mais do que 2,5mm de diâmetro, há um requerimento

242 de FSH (PICTON et al., 1990; SCARAMUZZI et al., 1993; SCARAMUZZI et al.,
243 2011). Esse aumento de FSH é causado pelo desaparecimento momentâneo
244 do feedback negativo (estradiol e inibina) quando um folículo dominante ovula
245 ou entra em atresia. O aumento do FSH induz o surgimento do grupo de
246 folículos dependentes de gonadotrofinas (SOUZA et al., 1998). Os folículos
247 desse estágio são os que possuem maior requerimento de FSH, características
248 que os distinguem dos demais e os tornam mais vulneráveis a entrar em
249 atresia (SCARAMUZZI et al., 1993).

250 Mais ou menos 3 dias após o surgimento desses folículos, um ou mais
251 atingem o *status* ovulatório (5-8 mm diâmetro). Folículos ovulatórios são
252 aqueles capazes de ovular dados o ambiente endócrino correto de estradiol
253 alto, progesterona baixa e alta frequência do pulso de LH (WEBB et al., 1989).

254 Os papéis relativos das gonadotrofinas em recrutar e selecionar o folículo
255 ovulatório ainda é incerto. E tem se mostrado que o FSH sozinho (PICTON et
256 al., 1990) pode estimular o crescimento do folículo ao tamanho ovulatório em
257 ovelhas. Essas observações sustentam a maioria dos dados para os quais
258 atribuem um papel essencial do FSH no controle do desenvolvimento folicular e
259 seleção (McNEILLY et al., 1991). O LH é necessário para o desenvolvimento e
260 manutenção do folículo antral. Em ovelhas tem-se demonstrado que no final do
261 desenvolvimento folicular, na maturação do folículo antral, e na ovulação
262 seguida da luteólise há uma dependência do aumento na pulsabilidade da
263 secreção de LH (BAIRD & McNEILLY et al., 1981).

264

265

266

2.4. Dinâmica folicular

É um processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais que permitem o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (LUCY et al., 1992).

Os ovários das ovelhas têm sido examinados com sucesso usando transdutor linear prostático humano de 7,5 MHz (GONZÁLES-BULNES, 2002).

Com a utilização da ultrassonografia, uma técnica não invasiva e repetitiva de monitorar o desenvolvimento de folículos, possibilitou compreender melhor a dinâmica folicular, caracterizando ondas, seleção, dominância e regressão dos grandes folículos.

Nas ovelhas, o crescimento folicular acontece na forma de ondas, podendo ocorrer de 2 a 4 com predomínio de 3, respectivamente, cerca de 0, 6, 11 do ciclo estral das ovelhas (GINTHER et al., 1995; BARTLEWSKY et al. 1999; LEYVA et al., 1999; VIÑOLES et al., 1999). A razão para essa variação não é sabida, mas há sugestões que está ligada às condições corporais (MURPHY et al., 1991). A emergência das ondas está determinada pelo FSH, e uma elevação nos níveis plasmáticos deste é observada um a dois dias antes de cada onda, a secreção pulsátil de FSH ocorre a cada 4-6 dias, o que resulta em três pulsos de gonadotrofinas e três ondas de crescimento folicular na maioria das ovelhas (GINTHER et al., 1995;).

No trabalho de Leyva et al., (1999) em ovelhas o diâmetro dos folículos grandes da segunda onda são menores do que os da primeira e terceira onda.

Existem fortes evidências que indicam que durante a primeira e a última onda folicular (ovulatória) ocorre a dominância. Um folículo do “pool” recrutado é selecionado e continuará crescendo enquanto os outros sofrem atresia (BAIRD & MCNEILLY., 1981).

292 O folículo maior de uma onda será o folículo ovulatório se conseguir
293 estabelecer uma cascata endócrina com o LH que resulte em um pico pré-
294 ovulatório de LH. Há opiniões divergentes entre os autores, sobre a existência
295 da dominância nas ondas intermediárias do ciclo estral em ovelhas (CASTRO
296 et al., 1999). O fato de mais de um folículo adquirir a habilidade de atingir o
297 tamanho pré-ovulatório em uma única onda sugere que a dominância folicular
298 em ovelhas é fraca (BARTLEWSKI et al., 1999).

299 Em vacas, o folículo dominante produz esteroides (estrógeno e
300 andrógenos), fatores não esteroidais (inibina, folistatina e fatores de
301 crescimento) que provocam alterações sistêmicas nas concentrações de FSH e
302 LH, prevenindo o crescimento do folículo subordinado, impedindo a próxima
303 onda folicular, terminando com a regressão ou ovulação desse folículo
304 (FORTUNE, 1994; ADAMS, 1999).

305 Vários estudos têm demonstrado a importância do sistema ativina-
306 folistatina no controle da função ovariana. *In vitro*, a ativina-A estimula a
307 proliferação das células da granulosa nos folículos pré-antrais e início do antro,
308 além de regular os receptores de FSH e a atividade da aromatase induzida por
309 este hormônio. Em adição, retarda a luteinização e a atresia nos grandes
310 folículos antrais elevando a maturação do oócito. Por outro lado, a folistatina
311 atenua as ações da ativina-A e pode promover a luteinização e atresia dos
312 grandes folículos antrais. (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

313 McNATTY e colaboradores (1982) sugeriram que o folículo pré-ovulatório
314 apresenta-se como folículo estrogênico grande após 10h da luteólise de um
315 “pool” de folículos presente naquele momento.

316 Outro trabalho demonstra que os folículos ovulatórios são derivados de
317 folículos de mais de 2 mm presente no momento da regressão luteal. Porém
318 folículos menores também podem ser capazes de ovular, assim, a seleção
319 ocorre em um prazo flexível antes ou após a luteólise. O folículo pré-ovulatório
320 normalmente é originado de uma população de folículos grandes presente no
321 momento da regressão luteal, mas a ovelha tem a habilidade de promover
322 folículos menores (Tsonis et al., 1984).

323 2.5. *Downregulation*

324 Por definição *downregulation* é um decréscimo no número de receptores
325 na superfície de uma célula alvo tornando a célula menos sensível a um
326 hormônio ou outro agente.

327 Em ratos (GARNER & BLAKE, 1979; CLAYTON, 1982), e mulheres
328 (RABIN & MCNEIL, 1980; HEBER & SWERDLOFF, 1981) foi observado que
329 após a administração aguda ou crônica de GnRH, ou de seus análogos, há
330 dessensibilização da pituitária ao estímulo do GnRH e/ou a depleção de LH e
331 FSH pela hipófise.

332 O processo de down regulation provocado pelo GnRH e seus agonistas
333 promove uma dessensibilização dos receptores hipofisários que
334 possivelmente ocorre devido a aceleração da internalização e degradação dos
335 receptores de GnRH, sem que ocorra uma resposta compensatória ou devido
336 ao desacoplamento dos receptores de GnRH ao seu segundo mensageiro
337 intracelular dentro das células gonadotróficas induzindo um efeito transitório de
338 insensibilidade (HUCKLE et al., 1988; SCHNEIDER et al., 2006). Teoricamente,
339 outros receptores hormonais presentes nos órgãos reprodutivos podem sofrer

340 dessensibilização devido ao uso contínuo de agonistas do GnRH (D'OCCHIO
341 et al., 2000).

342 Em ovinos após o tratamento com agonista do GnRH a resposta das
343 gonadotrofinas ao GnRH é totalmente abolida, confirmando a dessensibilização
344 atribuídos ao down regulation e a interrupção do sistema de segundo
345 mensageiro (TARAGNAT et al., 1998).

346 Ao utilizar infusão intravenosa de GnRH por um período de 24 horas,
347 Crowder e colaboradores (1986) concluíram que o processo de *downregulation*
348 em ovelhas é um fenômeno de curta duração havendo uma rápida recuperação
349 dos receptores de GnRH. A frequência e amplitude dos pulsos de LH e os
350 pulsos de GnRH, presumivelmente, também foram suprimidos pela exposição
351 contínua ao GnRH.

352 Visando melhorar a resposta aos protocolos de superovulação, Cognié e
353 colaboradores (2003) destacaram o uso de agonistas e antagonistas do GnRH
354 associado aos progestágenos com o objetivo de suprimir a liberação endógena
355 destas gonadotrofinas. Este conceito também foi utilizado em estudos de
356 superestimulação ovariana em que foram testados pré-tratamentos de duas
357 semanas com agonistas do GnRH (Buserelina 40 µg/dia - Receptal[®]; MSD
358 Animal Health) ou 10 dias com antagonista (Antarelix 0,5 mg/dia, Teverelix[®])
359 nos quais os autores obtiveram diminuição dos folículos maiores, aumento no
360 número dos folículos menores e consequente aumento na resposta ao FSH
361 exógeno em até 50% (GHARBI et al., 2012; COGNIÉ, 1999). Dufour e
362 colaboradores (2000) utilizaram o antagonista Antarelix por 10 dias no período
363 prévio à superovulação em ovelhas com o gene Booroola Fec e como resultado
364 observaram além da redução do número de folículos com mais de 2mm, a

365 redução nas concentrações de FSH e LH no início do tratamento
366 superovulatório.

367 Gharbi e colaboradores (2012) testaram o efeito do tratamento com
368 agonista do GnRH no crescimento folicular ovariano, na resposta aos
369 tratamentos de superovulação e na produção *in vivo* de embriões. Para isso,
370 utilizaram 20 ovelhas com o estro previamente sincronizado, as quais 10 delas
371 não receberam nenhum pré-tratamento antes do protocolo de superovulação
372 com FSH (Grupo controle), e nas outras 10 fêmeas foram aplicadas, durante 14
373 dias, injeções diárias por via subcutânea de 40µg de Busorelina antes do
374 protocolo com FSH. Os folículos foram divididos em pequenos (2-3mm),
375 médios (4-5mm) e grandes (≥6mm). O Grupo tratado com Busorelina mostrou
376 um significativo aumento no número de folículos pequenos (de 8 para 15
377 folículos) e supressão dos folículos médios e grandes (de 4 para 0), enquanto
378 no Grupo controle não foi observado nenhuma mudança significativa quanto ao
379 número de folículos pequenos (de 8 para 9) e na supressão de folículos médios
380 e grandes (de 2 para 2). A resposta ovulatória, determinada pelo número de
381 corpos lúteos, foi significativamente maior no grupo com o pré-tratamento,
382 aproximadamente 50% maior do que no Grupo controle. Após, as fêmeas
383 foram inseminadas e os embriões coletados por lavagem uterina. Comparando
384 as quantidades de embriões transferíveis das ovelhas do grupo sem tratamento
385 e as submetidas ao pré-tratamento com o agonista do GnRH foi observado
386 um aumento de 4 para 10 embriões, respectivamente. Portanto, este estudo
387 constatou que o tratamento com Busorelina aumentou significativamente o
388 número de folículos pequenos e conseqüentemente melhorou a resposta da
389 superestimulação ovariana e aumentou a quantidade sem afetar a qualidade

390 dos embriões transferíveis por ovelha, sendo então um tratamento viável e
391 apropriado para implementação na produção, preservação e transferência de
392 embriões em ovinos.

393 *2.6. Acetato de deslorelina*

394 A deslorelina é um análogo agonista do GnRH produzido pela substituição
395 da glicina na posição 6 pelo triptofano, retirando a glicina da posição 10 e
396 adicionando uma amida na prolina da posição 9 (6-D-triptofano-9-(N-etil-L-
397 prolinamida-10-Desglicinamida LH-RH). A potência biológica desta droga em
398 cães é cerca de 150 vezes maior que a do GnRH, além de apresentar maior
399 estabilidade (CONCANNON, 2005), induz uma liberação de LH cerca de sete
400 vezes maior do que o GnRH, possuindo ainda baixa degradação (COY &
401 SCHALLY, 1978), sendo cerca de 7 vezes mais potente que a busorelina
402 (KARTEN & RIVIER, 1986)

403 A deslorelina tem sido amplamente utilizada no controle reprodutivo das
404 espécies domésticas, principalmente na indução de ovulação de éguas em
405 estro (SQUIRES et al., 1994). Diferentes estudos em rebanhos de bovinos
406 leiteiros tem utilizado a deslorelina para investigações sobre o controle do
407 retorno à ciclicidade no período pós-parto (PADULA & MACMILLAN, 2002),
408 para a redução da perda gestacional no período embrionário tardio
409 (BARTOLOME et al., 2006) e nos protocolos de inseminação artificial em
410 tempo fixo (SANTOS et al., 2004).

411 Padula e Macmillan (2005) estudaram o efeito da deslorelina em 26 vacas
412 holandesas não lactantes que tiveram o estro sincronizado e após sua
413 detecção foram divididas em três Grupos de tratamento: 1) 100µg de deslorelina
414 por via intramuscular uma vez por semana durante seis semanas; 2) duas

415 aplicações por semana durante seis semanas; e 3) sem tratamento. Como
416 resultado, os autores obtiveram 70% para o Grupo 1 e 88% para o Grupo 2, de
417 animais em anestro total (baixos níveis de progesterona durante todo o
418 tratamento) ou parcial (nível de progesterona abaixo do Grupo controle), o
419 Grupo controle mostrou 100% dos animais com ciclo estral normal. Concluindo-
420 se então que repetidas aplicações de deslorelina alteram significativamente a
421 proporção de vacas com ciclos anormais variando entre anestro e ciclos
422 indistinguíveis do normal.

423 Com o surgimento dos agonistas com ligações fortes aos seus receptores
424 e as lentas taxas de degradação, a exemplo da deslorelina, vieram a gerar
425 efeitos de infertilidade, por levar à síndrome de hiperestímulo ovariano (COY &
426 SCHALLY, 1978). Os implantes de deslorelina subcutâneos de liberação lenta
427 utilizados em cães liberam quantidades mínimas do princípio ativo em padrão
428 bem definido, inibindo temporária e reversivelmente a produção de
429 gonadotrofinas e hormônios sexuais, por cerca de seis a doze meses (TRIGG
430 et al., 2001; WRIGHT et al., 2001). O uso desses implantes na reprodução
431 equina tem uma desvantagem potencial que é a necessidade de retirada
432 destes depois de confirmada a ovulação, já que sua permanência resulta em
433 supressão do crescimento folicular e maior intervalo interestral em éguas que
434 falharem na concepção. Esse atraso pode variar de três a mais de trinta dias
435 (McCUE et al., 2002; STITCH et al., 2004).

436 Segundo Leite (2012), o uso de implantes subcutâneos de liberação
437 controlada de deslorelina (Suprelorin[®]) em ovelhas provocou com eficiência a
438 supressão do crescimento folicular após sete dias de uso com uma média de
439 retorno a ciclicidade de onze dias após retirada do implante.

440 No tratamento crônico com agonistas do GnRH temos duas fase. A
441 primeira é caracterizada por um imediato aumento nas concentrações
442 plasmáticas de gonadotrofinas, estimulando o crescimento folicular e indução
443 da ovulação. A segunda fase é caracterizada pelo bloqueio dos pulsos de LH
444 que será mantido enquanto o agonista estiver presente (D'OCCHIO et al.,
445 2000).

446 **3. OBJETIVOS**

447 Este trabalho teve como intuito estudar formas de controle da atividade
448 de crescimento folicular ovariano da ovelha, pela administração continuada de
449 deslorelina, na forma injetável ou implante subcutâneo de liberação controlada,
450 hipotizando que haja supressão do crescimento folicular de maneira reversível.

451 Tendo como objetivos secundários:

- 452 • Avaliar o efeito da deslorelina sobre a sincronia da emergência de uma
453 nova onda de crescimento folicular após a interrupção do tratamento;
- 454 • Avaliar a funcionalidade do corpo lúteo pós-sincronização e pós-supressão.

455

456 **4. MATERIAL E MÉTODOS**

457 *4.1. Local de Experimentação e manutenção dos animais.*

458 O experimento foi conduzido, durante a transição de outono inverno, no
459 “Laboratório de Estudos de Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e
460 Caprinos” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da
461 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade
462 Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, situado à latitude de
463 22°53'09” Sul e longitude de 48°26'42” Oeste, estando a uma altitude de 804
464 metros.

465 Foram utilizadas inicialmente 30 fêmeas ovinas da raça Bergamácia,
466 provenientes do setor de ovinocultura da Fazenda Edgardia (UNESP-
467 Botucatu), selecionadas quanto ao estado corporal, estado clínico geral e
468 *status* reprodutivo.

469 As ovelhas receberam durante o período experimental água e sal mineral
470 *ad libitum*, além de serem mantidas em regime de confinamento, em piquetes,
471 alimentação com volumoso triturado e ração específica para manutenção de
472 ovelhas adultas (NUTRIZ; São Manuel; SP; Brasil).

473 4.2. Delineamento experimental

474 O presente trabalho foi cronologicamente constituído por etapas
475 experimentais onde os animais foram selecionados e divididos conforme o
476 descrito.

477 4.2.1. Cronologia e etapas experimentais

478 Cronologicamente o experimento constou de quatro etapas (Fig.1):

479 **Etapas I – Seleção dos animais** – As ovelhas passaram por um período
480 de adaptação ao novo ambiente e rotina de ultrassom e alimentação de
481 aproximadamente um mês, após esse período tiveram a ciclicidade ovariana
482 determinada por meio de quantificação de progesterona em amostras pareada
483 com intervalo de sete dias e detecção ultrassonográfica do corpo lúteo. Foram
484 mantidos no experimento apenas os animais (n=29) que atendiam aos critérios
485 de aptidão clínico-reprodutivo e ciclicidade.

486 **Etapas II – Sincronização do estro** - As ovelhas que foram consideradas
487 aptas para o experimento (n=29) tiveram o estro sincronizado pelo emprego de
488 dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona (Eazi-Breed
489 CIDR®; 0,33g de progesterona; Pfizer; São Paulo; Brasil) de segundo uso, por

490 12 dias e administração única, pela via intramuscular, de 350UI de eCG
491 (Novormon[®]; Intervet Schering-Plough; São Paulo; Brasil) concomitantemente
492 à retirada do dispositivo. A ocorrência do estro induzido e da ovulação foi
493 monitorada através de “rufiação”, exame ultrassonográfico e dosagem de
494 progesterona seis dias após a constatação da ovulação.

495 **Etapa III – Formação dos grupos experimentais e tratamentos** - Os
496 animais, que responderam a sincronização (n=22), foram randomicamente
497 distribuídos entre os quatro grupos experimentais e esta etapa teve início no
498 sexto dia após a ovulação sincronizada e com duração de sete dias. Durante
499 toda esta etapa as ovelhas tiveram o crescimento folicular monitorado por
500 ultrassonografia.

501 **Etapa IV – Pós-tratamento** – Iniciou após a interrupção dos tratamentos
502 e perdurou até a ocorrência da ovulação em 100% dos animais, sendo que seis
503 dias após foram coletadas amostras de sangue para quantificação de
504 progesterona. Nesta etapa, as ovelhas também foram monitoradas por
505 ultrassonografia para constatação do retorno a ciclicidade. As ovelhas foram
506 observadas por dois meses ao retornarem a sua atividade reprodutiva normal.

507 4.2.2. Grupos experimentais

508 Os animais foram randomicamente distribuídos entre os grupos:

- 509 • **G0 (Controle)** – Ovelhas (n=5) sem as aplicações de deslorelina
510 injetável ou implante subcutâneo;
- 511 • **G1 (DES 48h)** – Ovelhas (n=6) com aplicação de 100µg de deslorelina
512 injetável, pela via intramuscular, em intervalos de 48 horas durante sete
513 dias (DO – D7);

- **G2 (DES 72h)** – Ovelhas (n=5) com a aplicação de 100µg de deslorelina injetável pela via intramuscular, em intervalos de 72 horas durante sete dias (D0 – D7);
- **G3 (Implante)** – Ovelhas (n=6) com o implante subcutâneo contendo 4,7mg de deslorelina por sete dias (D0 – D7).

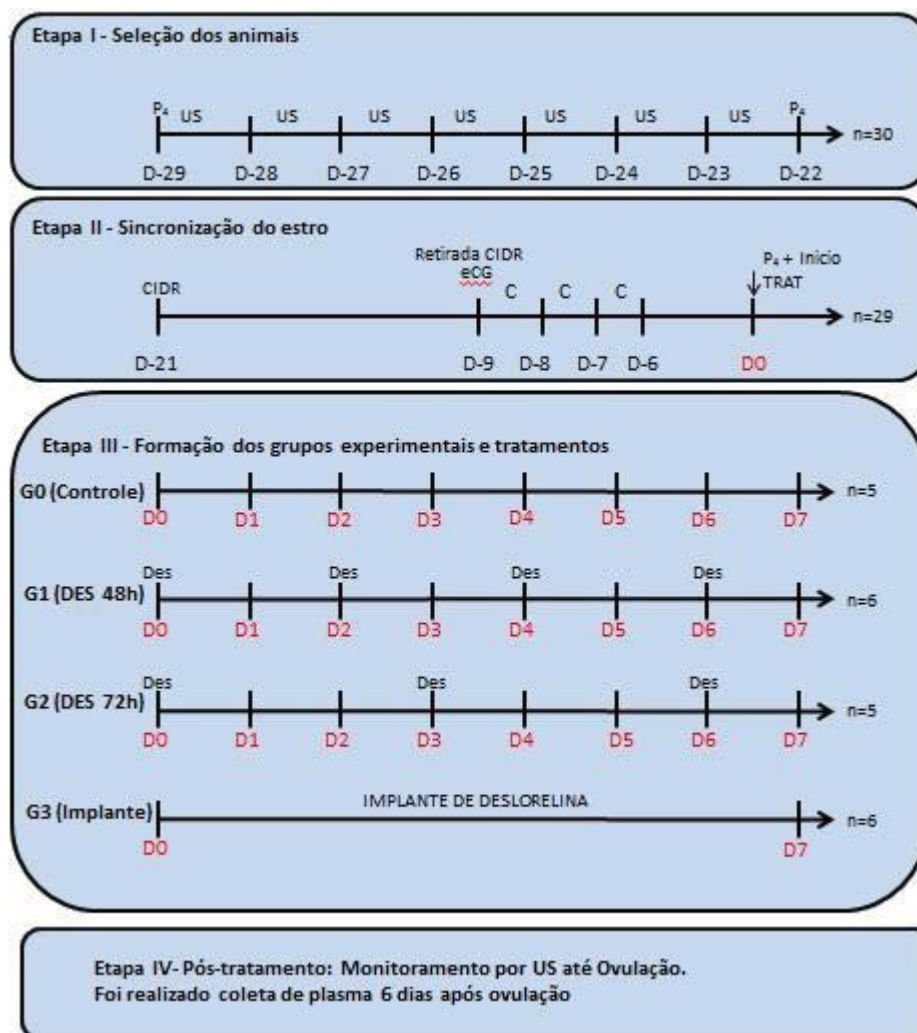


FIGURA 1 – Representação esquemática das etapas experimentais
US (Exame ultrassonográfico a cada 12 horas)
P₄ (Coleta de sangue para quantificação de progesterona)
C (Detecção do cio a cada 12 horas – “rufiação” e exame ultrassonográfico)
Des (100µg de deslorelina intramuscular)

4.3. Metodologias

4.3.1. Administração continuada de deslorelina injetável

Para administração injetável de deslorelina foi utilizado 0,4 mL do fármaco Sincrorrelin[®] da Ourofino (São Paulo; Brasil), que apresenta a concentração de 250µg/mL.

Por uma questão de padronização, as aplicações foram feitas por via intramuscular entre os músculos semitendinoso e semimembranoso.

Previamente à aplicação foi realizada antissepsia do local com iodopovidine tópico.

4.3.2. Aplicação e remoção dos implantes

Nos animais do G3 (Implante), por padronização os implantes contendo 4,7mg de deslorelina (Suprelorin[®]; Virbac; USA), foram inseridos no tecido subcutâneo da região auricular esquerda (face convexa da base da cartilagem conchal) utilizando-se aplicador apropriado (Fig.2).

Previamente à inserção do implante, foi feita na região uma pequena área de tricotomia, antissepsia com Iodopovidine tópico e anestesia local com lidocaína a 2%. Para a remoção do implante, os mesmos cuidados foram adotados, sendo realizada uma pequena incisão de pele sobre o dispositivo implantado para sua completa remoção, prevenindo-se sua fragmentação. Foi realizada a sutura de pele por um ponto simples com fio de nylon cirúrgico (2-0, agulhado). Cuidados usuais de curativo da região foram realizados até a plena cicatrização.



FIGURA 2 - A) Dispositivo de implante de deslorelina. 1) Seringa de aplicação, 2) Corpo do implante de 4,7mg e 3) Aplicador agulhado. B) Agulha 40x12 para comparação.

4.3.3. *Deteção do comportamento estral*

Diariamente, a cada 12 horas, em pequenos grupos, todas as ovelhas foram submetidas à identificação do cio, pela observação de eventuais manifestações estrais à proximidade de “rufiões”, clinicamente hígidros.

4.3.4. *Acompanhamento da atividade ovariana*

1 - *Procedimentos*

O acompanhamento foi realizado utilizando-se ultrassonografia modo – B (Prosound 2 VET; Aloka Co. Ltda; Japão) equipado com transdutor linear 7,5 MHz (Modelo UST-660-7.5; Aloka Co. Ltda; Japão) desenvolvido para exame transretal de próstata em humanos, mas validado para o presente estudo em ovinos (SCHRICK et al., 1993). As ovelhas, adequadamente contidas em estação, tiveram sua ampola retal esvaziada em seu conteúdo fecal e preenchida por mucilagem composta por uma solução aquosa de carboximetilcelulose, com o intuito de aumentar o contato do transdutor com a mucosa retal, permitindo a adequada formação da imagem durante o exame ultrassonográfico.

O transdutor foi introduzido no reto até a detecção da bexiga urinária e útero, a visualização dos ovários era obtida rotacionando o transdutor lateralmente, e quando necessário à imagem era gravada.

As imagens obtidas dos ovários foram desenhadas em esquemas bidimensionais, e os dados da mensuração das estruturas foram mapeados (Anexo 3) de maneira a permitir a identificação e acompanhamento das estruturas durante os dias subsequentes.

A análise retrospectiva do acompanhamento individualizado dos folículos em ambos os ovários em conjunto permitiu o estabelecimento do padrão de crescimento folicular durante as etapas.

Ao fim de cada exame, os animais receberam alimentação concentrada para produzir estímulo positivo ao seu condicionamento.

2- Critérios utilizados na avaliação ultrassonográfica

a) Critérios para a classificação dos folículos

Após a determinação do diâmetro, pela média de duas medidas, os folículos foram agrupados em três classes como se segue:

- **Folículo pequeno** com diâmetro de 2 a 2,9mm,
- **Folículo médio** com diâmetro de 3 a 4,4mm
- **Folículo grande** com diâmetro $\geq 4,5$ mm

b) Constatação da ovulação

A confirmação da ovulação foi estabelecida através do acompanhamento da evolução final do folículo em exames consecutivos, considerando como ovulação a não constatação do folículo pré-ovulatório no exame subsequente com posterior visualização do CL na região correspondente do mesmo ovário.

c) *Caracterização da supressão do crescimento folicular*

A supressão do crescimento folicular após o tratamento foi evidenciada na população de folículos médios e grandes, pela ocorrência de ovulação, luteinização ou atresia.

A luteinização foi caracterizada pelo desenvolvimento anormal, acima de 10 mm de diâmetro, do maior folículo, sendo seu conteúdo preenchido gradativamente por trabéculas e finalizando com formação de estrutura hiperecótica similar ao CL.

Atresia folicular foi marcada pela estagnação temporária no desenvolvimento de um determinado folículo com diminuição subsequente de seu diâmetro, até seu completo desaparecimento.

d) *Retorno do crescimento folicular e da atividade cíclica pós-tratamento*

O retorno do crescimento folicular foi caracterizado, naquelas ovelhas que possuíam folículos ovarianos pequenos ao final do tratamento, pelo reaparecimento de folículos médios com diâmetro entre 3 a 4,5mm e naquelas sem nenhum folículo ovariano ao final do tratamento pela constatação do primeiro folículo maior que 2 mm de diâmetro.

O retorno da ciclicidade após a retomada do crescimento folicular foi estabelecido pela ocorrência de manifestações estrais à proximidade dos “rufiões” e constatação da primeira ovulação, com confirmação da funcionalidade do CL, pela quantificação da progesterona seis dias pós-ovulação.

3 - Momentos das avaliações da atividade ovariana

A localização dos CL, como estrutura hiperecótica em relação ao estroma ovariano, foi realizada aos primeiros exames ultrassonográficos para:

- a) Constatação da ciclicidade na Etapa I de Seleção dos animais.
- b) No sexto dia após o desaparecimento do folículo pré-ovulatório (FPO) para constatação das ovulações sincronizadas (início da Etapa III).
- c) Durante a Etapa III, para a constatação do efeito dos tratamentos sobre a ocorrência de ovulações ou luteinização de folículos.
- d) No final da Etapa IV, para a comprovação do retorno à atividade cíclica.

O acompanhamento do crescimento folicular foi feito nos momentos:

- a) Etapa I: os exames foram realizados duas vezes ao dia para constatação da ciclicidade.
- b) Etapa II: duas vezes ao dia para o monitoramento da resposta ovariana aos procedimentos de sincronização.
- c) Etapa III: um exame diário realizado para a constatação dos efeitos de supressão do crescimento folicular.
- d) Etapa IV: após o término dos tratamentos, uma vez ao dia até constatação de pelo menos um folículo $\geq 4,5\text{mm}$, passando-se então a dois exames diários até constatação da ovulação.

4.3.5. Confirmação da funcionalidade do corpo lúteo

A confirmação da funcionalidade do corpo lúteo foi dada através de quantificação de progesterona no plasma sanguíneo nos momentos citados anteriormente.

647 As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, em tubos
648 a vácuo contendo EDTA K2 jateado na parede interna, mantidos sob-
649 refrigeração até a centrifugação (1200xg/10 minutos). O plasma foi mantido sob
650 congelação a 20°C negativos até o momento da quantificação hormonal. As
651 quantificações de progesterona foram realizadas no Laboratório de
652 Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia
653 Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
654 Estadual Paulista (UNESP – SP), utilizando kits comerciais de elevada
655 especificidade para progesterona em fase sólida (RIA Progesterone; Beckman
656 Coulter; Praga) e contador gama automatizado (Automatic Gamma Counter
657 Perkin Elmer Wizard 1470; USA) sendo os dados expressos em ng/mL.

658 Valores de progesterona iguais ou superiores a 1 ng/mL foram
659 considerados indicativos de atividade luteal.

660 *4.4. Análise estatística*

661 Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-
662 Smirnov, e por não apresentarem normalidade, optou-se por realizar a análise
663 estatística pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn
664 para as comparações das médias, estabelecendo como nível de significância
665 $\alpha=0,05$. Empregou-se o programa GraphPad Prism[®], versão 5.03 para
666 Windows.

667

668 **5. RESULTADOS**

669 A totalidade dos animais (100%) utilizados no experimento (n=22)
670 respondeu ao protocolo de sincronização da ovulação empregado, sendo que

671 todos apresentaram níveis de progesterona acima de 1 ng/mL pós-ovulação. A
 672 resposta ao protocolo de sincronização do estro está demonstrada na Tab.1.

673 **TABELA 1** - Percentual de resposta (Total) das ovelhas Bergamácia ao protocolo de
 674 sincronização pelo emprego do dispositivo intravaginal Eazi-Breed CIDR[®], de segundo uso, por
 675 12 dias e administração de 350UI de eCG.

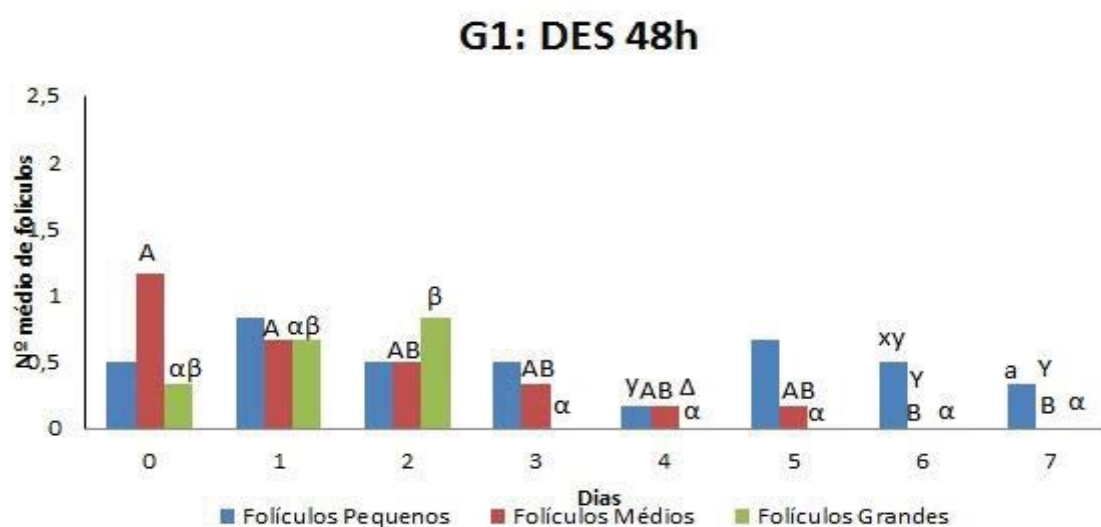
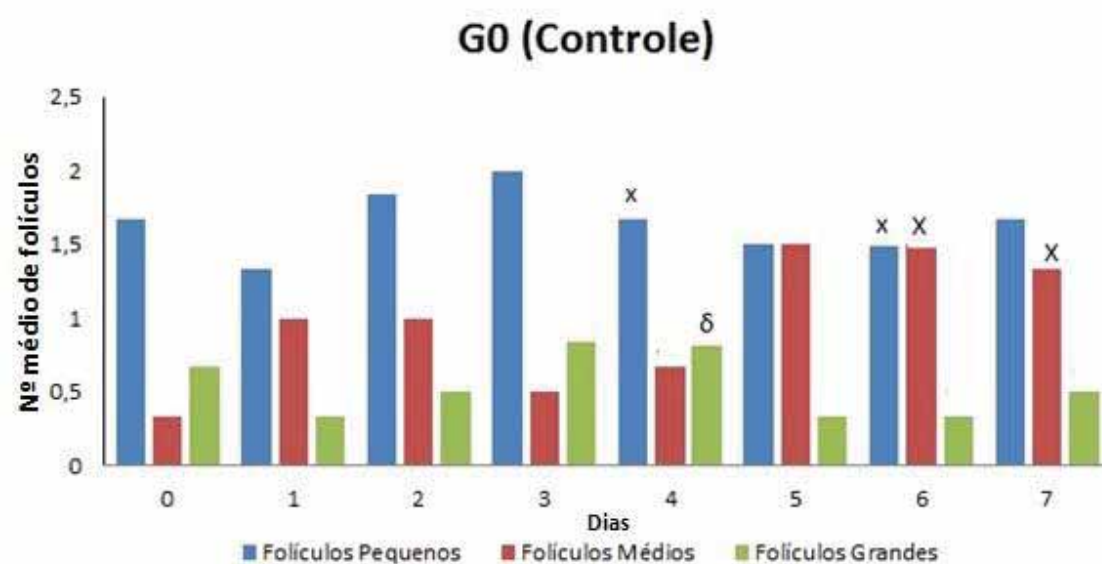
Resposta	Horas após retirada do dispositivo			
	48	60	96	120
% Cio	60,9 (60,9)	39,1 (100)	0,0 (100)	0,0 (100)
% Ovulação	0,0 (0,0)	54,0 (54,0)	29,9 (83,9)	16,1 (100)

676

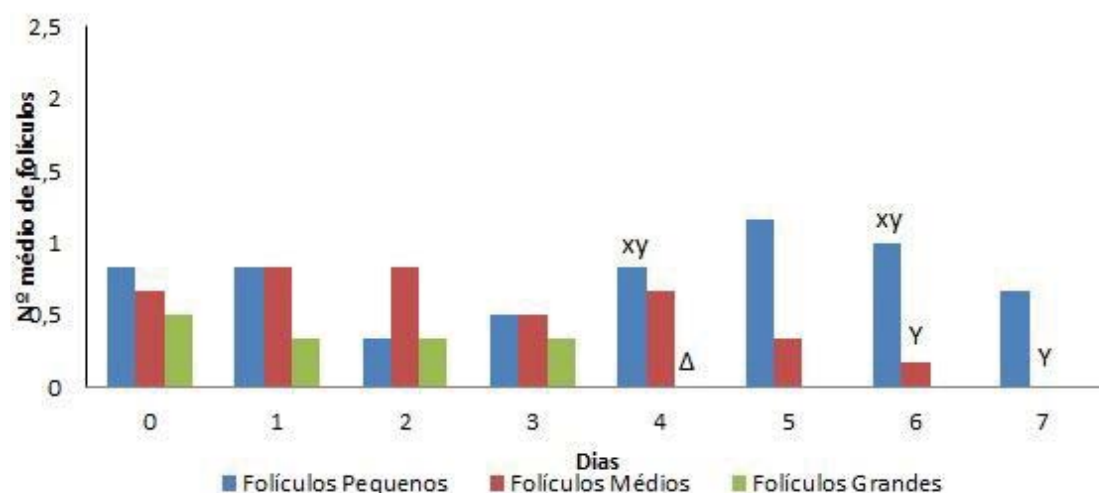
677 Não foram constatadas reações adversas nos locais de colocação dos
 678 implantes e de aplicações de acetato de deslorelina.

679 A Fig.3 tem por finalidade demonstrar, o efeito supressivo nas classes de
 680 folículos médios e grandes, nos grupos experimentais, no qual o dia zero (D0)
 681 representa a verificação ultrassonográfica antes do início do tratamento e do
 682 dia um (D1) em diante corresponde aos dias subsequentes terminando até o
 683 término do tratamento (D7). A população folicular foi comparada por classe
 684 dentro do mesmo grupo e entre os grupos durante o período de tratamento
 685 com deslorelina. O G0 (Controle) não apresentou diferença ($p>0,05$) entre as
 686 classes de folículos ao longo do tratamento sendo que devido ao tempo
 687 decorrido pós-sincronização não se conseguiu caracterizar o padrão de ondas.
 688 Para o G1 (DES 48h), não houve diferença na classe de folículos pequenos,
 689 porém com diferença ($p<0,05$) na classe de folículos médios ao longo do
 690 tratamento a partir do D6 em relação ao D0 e para a classe de folículos
 691 grandes houve diferença no D2, quando comparado aos demais dias atribuída
 692 às ovulações ocorridas durante o tratamento. Para o G2 (DES 72h) não houve
 693 diferença nas classes de folículos pequenos, médios e grandes. Para o G3
 694 (Implante) não houve diferença na população de pequenos folículos ao longo

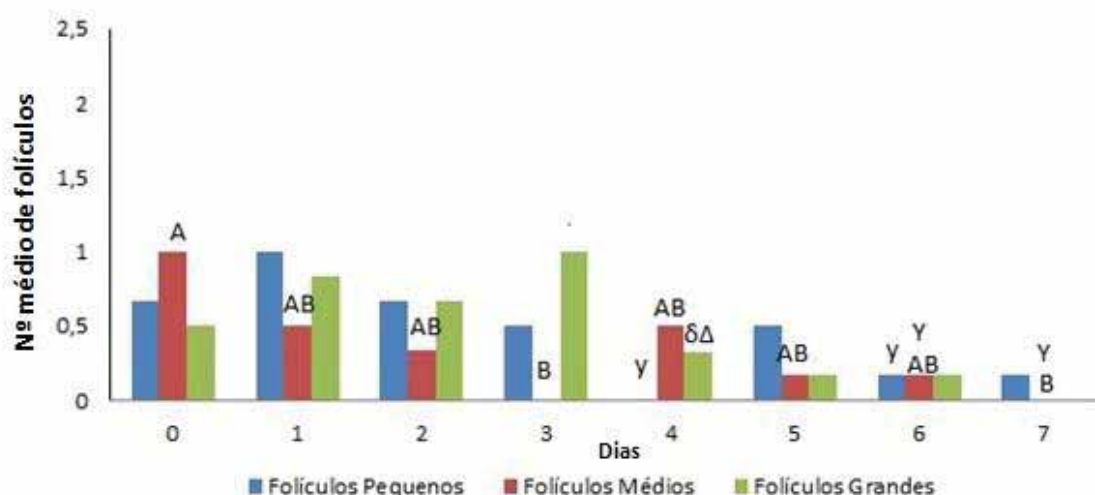
do tratamento, na classe de folículos médios houve diferença no D3 e no D7 em relação ao D0, na classe de folículos grandes não houve diferença ao longo do tratamento.



G2: DES 72h



G3 (Implante)



Distintas letras minúsculas (a, b) indicam diferença ($p < 0,05$) na classe de folículos pequenos do mesmo grupo.
 Distintas letras maiúsculas (A, B) indicam diferença ($p < 0,05$) na classe de folículos médios do mesmo grupo.
 Distintas letras gregas (α , β) indicam diferença ($p < 0,05$) na classe de folículos grandes do mesmo grupo.
 Distintas letras minúsculas (x, y) indicam diferença ($p < 0,05$) na classe de folículos pequenos entre os diferentes grupos.
 Distintas letras maiúsculas (X, Y) indicam diferença ($p < 0,05$) na classe dos folículos médios entre os diferentes grupos.
 Distintas letras gregas (δ , Δ) indicam diferença ($p < 0,05$) na classe dos folículos grandes entre os diferentes grupos.

FIGURA 3 - Número médio de folículos nos grupos experimentais G0 (Controle; $n=5$), G1 (DES 48h; $n=6$), G2 (DES 72h; $n=5$) e G3 (Implante; $n=6$), distribuídos nas classes pequenos (2 a 2,9 mm), médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) nos sete dias em que ocorreram os tratamentos em ovelhas Bergamácia.

Quando comparada as classes de folículo entre os grupos e entre dia de tratamento, o D0 não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos, demonstrando a eficácia da sincronização, pois os grupos encontravam-se em mesma fase de crescimento folicular.

718 Comparando a classe de folículos pequenos entre os grupos, houve
719 diferença ($p < 0,05$) no D4 entre o G0 (Controle) e o G1(DES 48h) ($1,6 \pm 0,81$ vs
720 $0,16 \pm 0,40$) e entre o G0 (Controle) e o G3(Implante) ($1,6 \pm 0,81$ vs 0 ± 0) e no
721 D6 entre o G0 (Controle) e o G3 (Implante) ($1,5 \pm 0,83$ vs $0,14 \pm 0,40$)

722 Comparando a classe de folículos médios entre os grupos ao longo do
723 tratamento foi encontrada diferença entre o G0 (Controle) com os demais
724 grupos a partir do D6, atribuída aos efeitos supressivos dos tratamentos sobre
725 o crescimento folicular. Não houve diferença entre o G1 (DES 48h), G2 (DES
726 72h) e G3 (Implante).

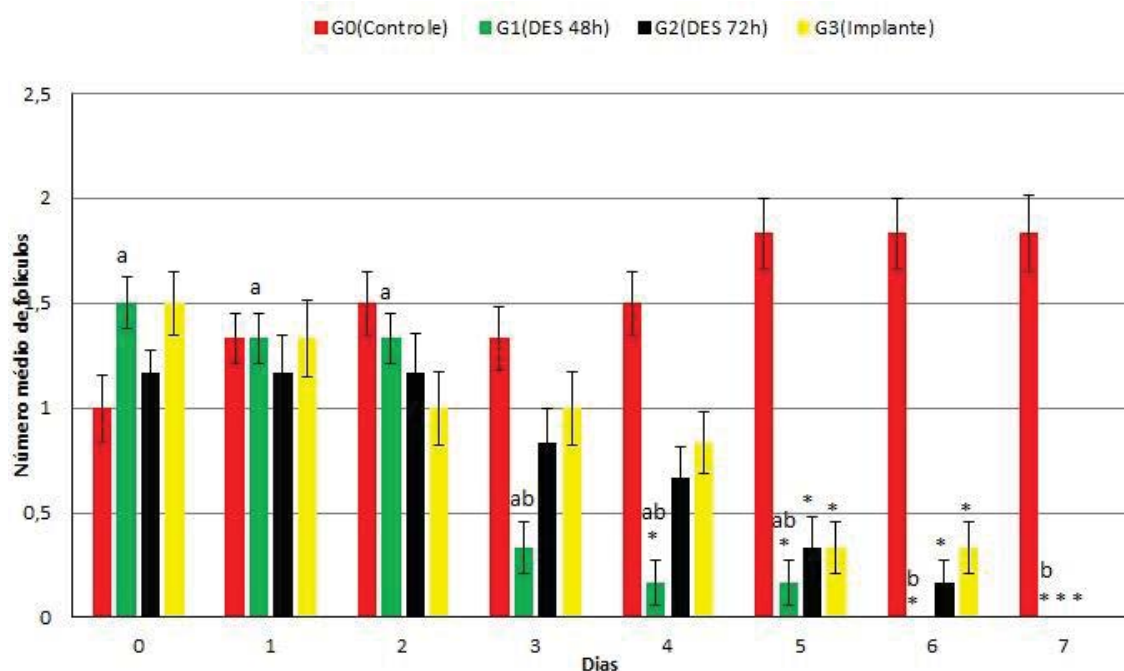
727 Comparando a classe de folículos grandes houve diferença entre o G0
728 (Controle) e o G1 (DES 48h) somente no D4 ($0,83 \pm 0,75$ vs 0 ± 0), entre o G0
729 (Controle) e o G2 (DES 72h) somente no D4 ($0,83 \pm 0,75$ vs 0 ± 0). Essa
730 diferença foi atribuída à ocorrência de ovulações após a administração do
731 acetato de deslorelina. Não havendo diferença entre o G0 (Controle) e o G3
732 (Implante) para esta classe de folículo.

733 No G1 (DES 48h) pôde-se observar ausência de folículos médios a partir
734 do D6 e de folículos grandes a partir do D3. No G2 (DES 72h) observou-se
735 ausência de folículos médios no D7 e de folículos grandes a partir do D4. Para
736 o G3 (Implante) constatou-se ausência de folículos médios e grandes no D7.
737 Entretanto, não foi possível a comprovação desses achados atribuindo-os aos
738 efeitos dos tratamentos, devido ao baixo número de folículos que compuseram
739 a análise estatística.

740 Para melhor demonstrar o efeito supressivo sobre o crescimento folicular
741 ao longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina, as classes de
742 folículos médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) foram agrupadas (Fig.4).

O G0 (Controle) diferiu dos demais grupos nos momentos D4 em diante para o G1 (DES 48h) e a partir do D5 para o G2 (DES 72h) e G3 (Implante).

Do D6 em diante não foram observados folículos maiores que 2,9mm no G1 (DES 48h) e no D7 nos grupos G2 (DES 72h) e G3 (Implante).



Distintas letras minúsculas (a,b) indicam diferença na população de folículos durante os dias no G1(DES 48h) ($P < 0,05$)

Diferença ($P < 0,05$) na população de folículos entre os grupos durante os dias são indicados por (*)

FIGURA 4 - Número médio e erro padrão da somatória de folículos médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) nos grupos G0 (Controle), G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante), distribuídos ao longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina em ovelhas Bergamácia.

No G1 (DES 48h) a soma das classes de folículos médios e grandes diferenciou do D6 em diante em relação ao D0, evidenciando-se decréscimo, da população folicular em decorrência do tratamento com quatro aplicações de deslorelina, intervaladas de 48 horas.

Ao longo do tratamento em duas ovelhas do G1 (DES 48h), uma do G2 (DES 72h) e três do G3 (Implante) o crescimento folicular foi interrompido totalmente não sendo observado nenhum folículo no D7.

A Tab.2 demonstra o comportamento ovariano das ovelhas após o início do tratamento. Foram observadas três respostas diferentes, a qual 47,06% (8

animais apresentaram ovulações, 29,41% (5) apresentaram luteinização e 23,53% (4) ovelhas os folículos regrediram e não cresceram ao decorrer do experimento. No G0 (controle) não foi observado nenhum desses fenômenos.

TABELA 2 - Resposta ovariana, após início dos tratamentos com acetato de deslorelina durante e após 48 horas nos grupos, G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) em relação às ovulações, luteinizações e atresias ocorrida nos folículos de ovelhas Bergamácia atribuídas ao efeito do fármaco.

Resposta	G1 (DES 48h)			G2 (DES 72h)			G3 (implante)			TOTAL	
	24h	48h	>48h	24h	48h	>48h	24h	48h	>48h	n	%
Ovulações	1	0	3	1	0	1	0	1	1	8	47,1
Luteinizações	0	0	2	0	0	1	0	0	2	5	29,4
Atresias	0	0	0	0	0	2	0	1	1	4	23,6

Em G0 (Controle) nenhuma ocorrência de ovulação, luteinização ou atresia.

Na Tab.3 são apresentados os tempos decorridos para supressão dos folículos médios e grandes e retorno do crescimento folicular, não havendo diferença ($p>0,05$) entre os grupos de tratamentos.

TABELA 3 - Tempo médio $\pm$ desvio padrão em dias nos grupos G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) para a Supressão dos folículos médios e grandes e o tempo do retorno do crescimento folicular após a interrupção do tratamento com acetado de deslorelina.

Grupo	Supressão Fol. Médio e Grandes		Retorno crescimento folicular	
	Tempo (dia)	Nº / Total*	Tempo (dia)	Nº/ Total*
G1 (DES 48h)	4 $\pm$ 1,09	6/6	3,8 $\pm$ 0,8	6/6
G2 (DES 72h)	4,2 $\pm$ 2,2	5/5	2,4 $\pm$ 0,5	5/5
G3 (Implante)	4,1 $\pm$ 1,8	6/6	3,3 $\pm$ 2,0	6/6

*Número total de animais por subgrupos.
No G0 (Controle) não ocorreu supressão folicular
($P>0,05$)

Na Tab.4 são apresentados os tempos decorridos entre o retorno do crescimento folicular e ocorrência de ovulação e o tempo entre a interrupção do tratamento e a ocorrência da ovulação, não havendo diferença ($p>0,05$) entre os grupos tratamentos.

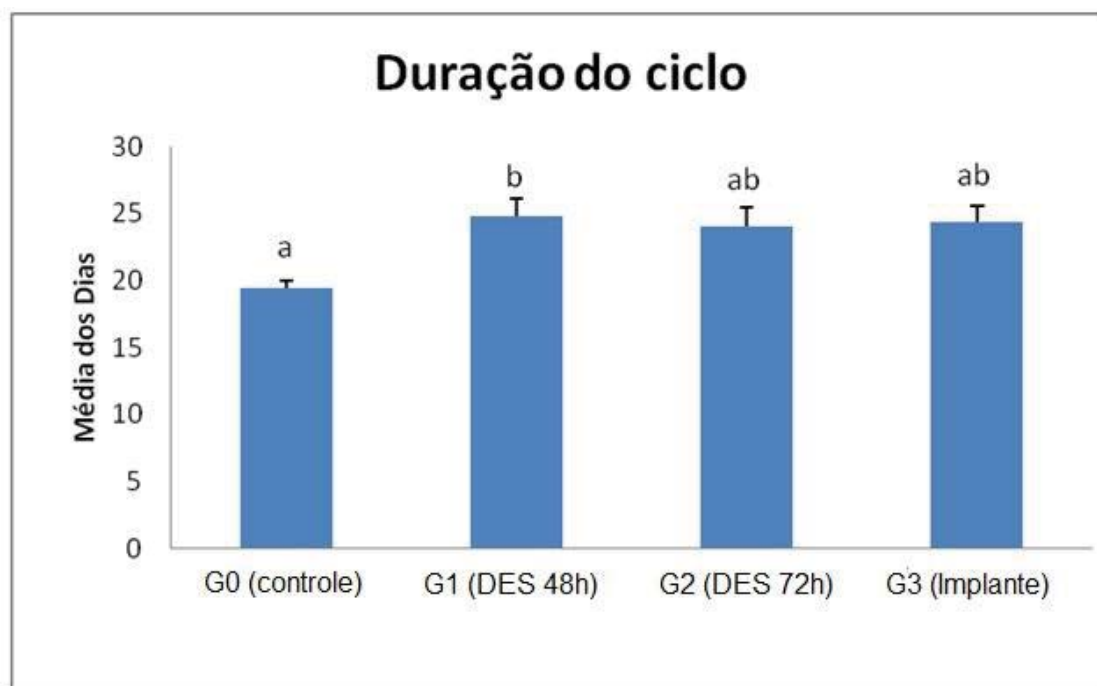
TABELA 4 - Tempo médio $\pm$ desvio padrão em dias dos grupos G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) para ocorrência das ovulações (Ovulação relacionada com retorno do crescimento folicular e ovulação relacionada com a interrupção do tratamento).

Grupo	Ret. Do crescimento*/ovulação	Interrupção do Trat/ovulação	Nº Ovulação/ Nº Total
G1 (DES 48h)	8,1 $\pm$ 2,9	12 $\pm$ 3,5	6/6
G2 (DES 72h)	8,4 $\pm$ 3,5	10 $\pm$ 3,4	5/5
G3 (Implante)	9,0 $\pm$ 1,6	12 $\pm$ 3,2	6/6

*Retorno do crescimento folicular.

No G0 (Controle) como não ocorreu supressão folicular não foi analisado o retorno do crescimento folicular. (P>0,05)

A Fig.5 demonstra a duração do ciclo estral dos animais entre a ovulação ocorrida devido à sincronização e a ovulação após o tratamento. Ocorre um aumento da duração do ciclo em todos os grupos tratamento em relação ao grupo controle, porém só houve diferença ($p<0,05$) no G1 (DES 48h) em relação ao G0 (Controle).



Distintas letras minúsculas (a, b) indicam diferença ($P<0,05$) entre os grupos.

FIGURA 5: Duração do ciclo estral, em dias (Média), das ovelhas divididas nos grupos G0 (Controle), G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante), os dias compreendem o tempo entre a ovulação ocorrida no protocolo de sincronização e a ovulação ocorrida após o término dos tratamentos.

810 6. DISCUSSÃO

811

812 O protocolo utilizado para a sincronização foi 100% eficaz como
813 demonstrado na Tab.1 Isso também foi descrito no trabalho de Oliveira (2011),
814 onde foram utilizados dispositivos de segundo uso em um protocolo de 14 dias.

815 Rubianes e colaboradores (1998), também utilizaram dispositivos de
816 segundo uso em protocolos de sincronização semelhante ao do presente
817 trabalho, em cabras, quando os dispositivos foram retirados foi administrado
818 uma dose única de eCG. Foi observado cio em 100% dos animais 48 horas
819 após a retirada dos dispositivos.

820 Não foram constatadas reações adversas nos locais de colocação dos
821 implantes e de aplicações de acetato de deslorelina, apesar de haver relato na
822 literatura (GÜNGÖR et al, 2007). Tanto os implantes quanto a deslorelina
823 injetável podem ser utilizados com segurança.

824 No G3 (Implante), As remoções, apesar da fragmentação do dispositivo,
825 foram realizadas sem dificuldades e sem problemas para a cicatrização após a
826 remoção, semelhante ao relatado em outros trabalhos (LEITE, 2012).

827 Os implantes foram aplicados na orelha, porém há relatos do uso no
828 pescoço em ovelhas (GÜNGÖR et al., 2007) e gatas (ACKERMANN, 2012),
829 não sendo relatado a fragmentação do implante.

830 No presente trabalho, o uso do acetado de deslorelina promoveu
831 supressão dos folículos médios e grandes em todas as ovelhas, tanto na forma
832 de implante quanto na forma injetável, podendo ser observado na Fig.3 e Fig.4
833 o decréscimo das classes de folículos com o passar do tempo sob a influência
834 do acetado de deslorelina. Achados semelhantes foram encontrados no
835 trabalho de Leite e colaboradores (2012).

836 Na Fig.3 no G1 (DES 48h) e no G3 (Implante) são constatados diferenças
837 ($p<0,05$) na classe de folículos médios durante os dias, D6 e D7
838 respectivamente, e na classe de folículos grandes é constatado diferença
839 somente no D2 no G1 (DES 48h) que é atribuído às ovulações, essas
840 observações não ocorrem em nenhuma classe de folículos no G2 (DES 72h).
841 Essas diferenças no G2 (DES 72h) podem ser atribuídas às aplicações serem
842 feitas a cada 72 horas (três aplicações) ocorrendo uma resposta menos
843 uniforme devido a um menor estímulo hormonal nesse grupo de ovelhas em
844 relação aos demais.

845 Apesar de em todos os grupos tratamento os folículos médios e grandes
846 chegarem à zero na fig.3, só é demonstrado isso estatisticamente na classe
847 dos folículos médios que diferem do G0 (Controle) do D6 em diante, devido ao
848 baixo número de folículos que compuseram a análise estatística.

849 Para melhor demonstrar o efeito supressivo sobre o crescimento folicular
850 ao longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina, as classes de
851 folículos médios (3 a 4,5mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm), que são as classes de
852 folículos alvo do trabalho, foram agrupadas (Fig.4).

853 Com isso a diferença ($p<0,05$) aparece no D4 para o G1 (Des 48h) e no
854 D5 para o G2 (DES 72h) e G3 (Implante) em relação ao G0 (Controle).
855 Somente o G1 (DES 48h) demonstrou diferença na soma de folículos médios e
856 grandes ao longo dos dias quando comparado com ele mesmo, demonstrando
857 um comportamento melhor e mais homogêneo que os demais grupos,
858 sugerindo um melhor efeito supressivo desse tratamento. O menor intervalo de
859 aplicação nesse grupo provavelmente está promovendo um estímulo melhor e
860 mais uniforme que nos demais grupos. Como demonstrado em outros trabalhos

861 com bovinos o aumento da concentração do agonista promove uma resposta
862 mais rápida (D'OCCHIO et al., 2000)

863 No presente estudo a ação da deslorelina, além da atresia folicular, foi
864 promover ovulações e luteinizações de folículos classificados como médios e
865 grandes. A ovulação de folículos médios e grandes pode ser explicada porque
866 os folículos potencialmente ovulatórios, são aqueles que adquirem receptores
867 de LH e secretam grandes quantidades de estradiol sendo capaz de ovular
868 dado o ambiente endócrino de estradiol alto, progesterona baixa e alta
869 frequência do pulso de LH (SCARAMUZZI et al., 2011), o que foi promovido
870 inicialmente com o tratamento. Com isso evidenciou-se o alto potencial do
871 acetato de deslorelina em promover ovulações em folículos médios e grandes.
872 Resultado semelhante foi obtido em 14 novilhas, a qual 11 tiveram ovulações
873 dentro de 2 a 3 dias após o início do tratamento com aumento significativo nas
874 concentrações séricas de progesterona detectado dois dias mais tarde (GONG
875 et al., 1995)

876 No tratamento crônico com agonistas do GnRH a primeira característica é
877 um imediato aumento nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas,
878 estimulando o crescimento folicular e indução da ovulação (D'OOCHIO et al.,
879 2000; WEI et al., 2012).

880 O tratamento promoveu o aumento de estruturas lúteas dos grupos
881 tratamentos em relação ao G0 (Controle)

882 Em bovinos autores relataram o efeito supressivo do acetato de
883 deslorelina. Estudo realizado com novilhas mestiças de Zebu com implantes
884 contendo quantidades crescentes de deslorelina suprimiram o crescimento
885 folicular ovariano, ovulação e concepção de modo dose-dependente por até 12

886 meses. As novilhas tinham aproximadamente 26 meses de idade e com ciclos
887 regulares no momento da implantação do acetato de deslorelina. Após dois
888 meses de tratamento, o crescimento folicular na maioria das novilhas foram
889 restrito a $\leq 5\text{mm}$ (D'OCCHIO et al., 2000).

890 Padula e Macmillan (2005) estudaram o efeito da deslorelina injetável em
891 26 vacas holandesas não lactantes e concluíram que repetidas aplicações de
892 deslorelina alteram significativamente a proporção de vacas com ciclos
893 anormais variando entre anestro e ciclos indistinguíveis do normal.

894 Foi demonstrado que o efeito supressivo da atividade folicular ovariana,
895 em tratamentos a longo prazo com o agonista do GnRH, é devido a
896 insuficiência da gonadotrofina, em vez da ação direta do agonista nos ovários
897 (D'OCCHIO et al., 1997), pois a exposição prolongada conduz a uma fase
898 crônica durante a qual a secreção pulsátil de LH é bloqueada (D'OCCHIO &
899 ASPDEN, 1996). A falta de secreção pulsátil de LH, e provavelmente FSH, é
900 mantida durante o tempo que agonista de GnRH esta presente na circulação, a
901 uma concentração limiar (D'OCCHIO & ASPDEN, 1996) e como consequência
902 a falta de gonadotrofinas inibe o desenvolvimento folicular (PADULA et al.,
903 2005). O fato de os tratamentos serem realizados de forma aguda (sete dias)
904 no presente estudo impossibilita observar esse evento e ocorre um retorno
905 mais rápido da atividade cíclica porque na maioria das ovelhas foi observada a
906 presença de folículos pequenos ao final do tratamento.

907 Quanto ao retorno do crescimento folicular não foi observada diferença
908 entre os grupos tratamentos como demonstrado na Tab.3, diferente do ocorrido
909 no trabalho de Leite e colaboradores (2012)

910 Quando observou-se o intervalo entre o retorno do crescimento folicular e
911 a ovulação em todos os grupos, pode-se ver que é exatamente o intervalo de
912 uma onda e não há diferença entre os tratamentos (Tab.4). Então o acetato de
913 deslorelina promoveu a supressão folicular e sincronizou o início de uma nova
914 onda. Takada e colaboradores (2004) utilizaram estrógeno na tentativa de
915 provocar atresia dos folículos e sincronizar uma nova onda. As doses
916 empregadas (0,1 a 0,3mg) na colocação da esponja de progesterona não
917 provocou a atresia dos folículos pequenos e não interferiu no crescimento e no
918 diâmetro do folículo maior, o folículo continuou crescendo normalmente, a
919 emergência de uma nova onda de crescimento folicular não foi sincronizada.

920 Todos os animais responderam positivamente aos rufões no retorno a
921 ciclicidade.

922 No trabalho de Leite e colaboradores (2012) quanto mais tempo os
923 animais ficaram com os implantes de deslorelina mais esse animais
924 demoraram em ovular após a sua retirada.

925 O anestro provocado pelo acetado de deslorelina pode ser mais rigoroso
926 que o anestro estacional, porque durante todo o anestro em ovelhas há
927 desenvolvimento folicular (BARTLEWSKI et al., 1998). O que difere nesse
928 estudo, onde após um tempo de tratamento não foi observado folículos maiores
929 que 2mm.

930 Tem-se sugerido que quando o primeiro pico pré-ovulatório de LH é
931 induzido, os grandes folículos nem sempre estão maduros a ponto de
932 desenvolver um corpo lúteo normal (HUNTER, 1991). No presente trabalho
933 isso não foi observado, em todos os animais foram feitas análises para

934 quantificação de progesterona após a primeira ovulação e foram obtidos
935 resultados acima de 1 ng/mL.

936 O retorno da ciclicidade em ovinos pode ser fértil, em bovinos
937 pesquisadores utilizaram implantes com diferentes doses de acetato de
938 deslorelina e ao retirar os implantes e acasalar as novilhas, a maioria estava
939 prenhe no prazo de 60 dias (DOCHHIO et al., 2000).

940 O presente estudo prova o efeito supressivo do acetato de deslorelina.
941 Autores relatam a idéia de que o tratamento superestimulatório iniciado na
942 ausência de folículos dominantes resulta no melhor recrutamento folicular,
943 taxas de ovulação e produção de embriões em ovinos (RUBIANES et al 1997;
944 GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002; D'OCCHIO et al., 2013).

945 Com isso existe a hipótese de que se os achados encontrados no
946 presente estudo forem aliados com a utilização dos protocolos de
947 superovulação, aumentara a sua eficiência, por fornecer o momento ideal para
948 a atuação do FSH exógeno.

949 Em ovelhas o tratamento com agonista do GnRH aumenta
950 significativamente o número de folículos pequenos e consequentemente
951 melhora resposta da superestimulação ovariana ao fazer a supressão de
952 folículos médios e grandes, melhora a resposta ovulatória e aumenta a
953 quantidade sem afetar a qualidade dos embriões transferíveis por ovelha
954 (GHARBI et al., 2012). O aumento no número de folículos menores pode ser
955 atribuído a supressão de folículos maiores que 4mm e por consequência uma
956 diminuição nos níveis de inibina A (GONZÁLES-BULNES et al., 2005).

957 Baseado nos resultados obtidos o momento ideal para o início da
958 superovulação no G1(DES 48h) seria no sexto dia de tratamento e no G2 (DES

959 72h) e G3 (Implante) o no sétimo dia, por não haver presença de folículos
960 médios e grandes (Fig.4).

961 **7. CONCLUSÕES.**

962 Tanto o implante subcutâneo de liberação continuada de acetato de
963 deslorelina, quanto às aplicações seriadas promovem a supressão do
964 crescimento folicular ovariano, pela ocorrência de ovulação, luteinização ou
965 atresia dos folículos médios e grandes com aumento do número de estrutura
966 lúteas.

967 A supressão ocorre de forma mais homogênea com quatro aplicações
968 intervaladas de 48 horas

969 As três aplicações intervaladas de 72 horas promovem a supressão
970 folicular, porém a maior parte dos folículos entram em atresia provocando uma
971 resposta mais tardia e menos homogênea.

972 Após a suspensão do tratamento com deslorrelina ocorre sincronização
973 de uma nova onda de crescimento folicular que resulta em ovulações e
974 formação de CL funcional. Não há diferença entre os tratamentos quanto aos
975 tempos de retorno do crescimento folicular e ocorrência de ovulação.

976 **8. REFERÊNCIAS.**

977 ACKERMANN, C.L. *Uso do acetato de deslorelina com contraceptivo em gatos*
978 *domésticos*. 2012. 121f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina
979 Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

980

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

983

- 984 AX, R. L.; RYAN, R. J. FSH stimulation of 3-glucosamine-incorporation into
 985 proteoglycans by porcine granulosa cells in vitro. *Journal of Clinical*
 986 *Endocrinology & Metabolism*. v.49, p.646-8, 1979.
- 987
- 988 BAIRD, D.T.; MCNEILLY, A.S. Gonadotrophic control of follicular development
 989 and function during the oestrus cycle of the ewe. *Journal of Reproduction and*
 990 *Fertility*. v.30, p.119-33, 1981.
- 991
- 992 BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ovarian
 993 follicular dynamics during anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*,
 994 v.113, p.275-85, 1998.
- 995
- 996 BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; CHANDOLIA, R.K.;
 997 HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics and
 998 their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in
 999 breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*.
 1000 v.115, p.111-24, 1999.
- 1001
- 1002 BARTOLOME, J.A.; KAMIMURA, S.; SILVESTRE, F.; ARTECHE, A.C.;
 1003 THATCHER, W.W. The use of a deslorelin implant (GnRH agonist) during the
 1004 late embryonic period to reduce pregnancy loss. *Theriogenology*, v.65, p.1443-
 1005 56, 2006.
- 1006
- 1007 BAZER, F. W.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; MIRANDO, M. A.; OTT, T.
 1008 L.; PLANTE, C. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in
 1009 ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.43, p.39-47, 1991.
- 1010
- 1011 CAHILL, L.P.; MARIANA, J. C.; MAULEON, P. Total follicle populations in ewes
 1012 with high and low ovulation rates. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.55, p.
 1013 27-36, 1979.
- 1014
- 1015 CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; RIVERO, A. Ovarian dynamics,
 1016 serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory
 1017 interval in goats. *Theriogenology*, v.52, p.399-411, 1999.

- 1018 CLAYTON, R.N. Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own
1019 pituitary receptors: evidence for biphasic regulation. *Endocrinology*, v.111,
1020 p.152-61, 1982.
1021
- 1022 COGNIÉ, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51,
1023 p.105-16, 1999.
1024
- 1025 COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of
1026 embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-88, 2003.
1027
- 1028 CONCANNON, P. W. Estrus induction in dogs: approaches, protocols and
1029 applications. In: *World Congress of the World Small Animal Veterinary*
1030 *Association*. 2005.
1031
- 1032 COY, D.H; SCHALLY, A.V. Gonadotrophin releasing hormone analogues.
1033 *Annual Clinical Research*, v.10, p.139, 1978.
1034
- 1035 CROWDER, M.E.; HERRING, R.D.; NETT, T.M. Rapid recovery of gonadotroph
1036 function after down-regulation of receptors for GnRH in ewes. *Journal of*
1037 *Reproduction and Fertility*, v.78, p.577-85, 1986.
1038
- 1039 D'OCCHIO, M.J.; ASPDEN, W.J. Characteristics of luteinizing hormone _LH.
1040 and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone
1041 _LHRH. and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist
1042 deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. *Biology of*
1043 *Reproduction*. v. 54, p. 45–52. 1996.
1044
- 1045 D'OCCHIO, M.J.; CREMONESI, F.; TRIGG, T.E.; ASPDEN, W.J.; BARUSELLI,
1046 P.S. Acute follicular response to FSH in heifers downregulated long term with a
1047 GnRH agonist and with suppressed ovarian follicular growth. *Theriogenology*,
1048 v.80, p.999-1005, 2013.
1049

- 1050 D'OCCHIO, M.J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T.R.; ASPDEN, W.J.; TRIGG, T.E.
 1051 Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproduction*
 1052 *Science*. v.60, p.433–42, 2000.
 1053
- 1054 D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; MACLELLAN, L.J.;
 1055 WALSH, J.; TRIGG, T.E.; MILLER, D. Use of a GnRH agonist to prevent the
 1056 endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in
 1057 heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation.
 1058 *Theriogenology*. v.47, p.601–13, 1997.
 1059
- 1060 DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N., MATZUK,
 1061 M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian
 1062 folliculogenesis. *Nature*. v.383, p.531–35, 1996.
 1063
- 1064 DUFOUR, J.J.; COGNIE, Y.; MERMILLOD, P.; MARIANA, J.C.; ROMAIN, R. F.
 1065 Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in
 1066 superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journal*
 1067 *Reproduction Fertility*. v.118. p.85-94, 2000.
 1068
- 1069 EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in
 1070 mammals. *Reproduction*. v.122, p.829–38, 2001.
 1071
- 1072 EVANS, G.; MAXWELL, C. Inseminación artificial en ovejas y cabras. In:
 1073 Salamon, S. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Zaragoza. Acribia.
 1074 P.158-161, 1990.
 1075
- 1076 FLINT, A.P.F.; SHELDRIK, E.L.; JONES, D.C.S.; AULETTA, F. J. Adaptations
 1077 to pregnancy in the interactions between luteal oxytocin and the uterus in
 1078 ruminants. *Journal Reproduction Fertility*. v.37, p.195-204, 1989.
 1079
- 1080 FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em
 1081 ovinos e caprinos. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. v.16, 2005.
 1082

- 1083 FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of
1084 primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction*
1085 *Science*. v.78, p.135–63, 2003.
- 1086
- 1087 FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals.
1088 *Biology of Reproduction*. v.50, p.225-32, 1994.
- 1089
- 1090 GARNER, L.L.; BLAKE, C.A. Morphological correlates for LHRH self-priming
1091 and anterior pituitary gland refractoriness to LHRH in proestrous rats: an
1092 immunocytochemical study. *Biology of Reproduction*. v.20, p.1055-66, 1979.
- 1093
- 1094 GHARBI, I.; FERROUK, M.; DECHICHA, A.; BARIL, G.; BECKERS. J.F.;
1095 GUETARNI, D. Follicular status and embryo production in ouled Djellal (Algeria)
1096 ewes breed pretreated with a GnRH Agonist. *Journal of Animal and Veterinary*
1097 *Advances*, v.6, p.791-98, 2012.
- 1098
- 1099 GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors:
1100 regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction*
1101 *Update*. v.14, p.159–77, 2008.
- 1102
- 1103 GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte–somatic cell
1104 interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction*
1105 *Science*. v.82, p.431–46, 2004.
- 1106
- 1107 GINTHER, O.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C. Associations between emergence
1108 of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous
1109 cycle in ewes. *Theriogenology*. v. 3, p.689-703. 1995.
- 1110
- 1111 GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R.
1112 Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on
1113 peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers.
1114 *Journal of Reproduction and Fertility*. v.105, p. 263-70, 1995.
- 1115

- 1116 GONZÁLEZ-BULNES, A.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; COCERO, M.J.;
 1117 GARCÍA-GARCÍA, R.M.; INSKEEP, E.K.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; McNEILLY,
 1118 A.S.; SANTIAGO-MORENO, J.; SOUZA, C.J.H.; VEIGA-LOPEZ, A. Multiple
 1119 factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in
 1120 sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*. v.16, p. 421-35,
 1121 2004.
- 1122
- 1123 GONZALEZ-BULNES, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.;
 1124 VEIGA-LOPEZ, A.; SOUZA, C.J.H.; MCNEILLY, A.S. Restoration of endocrine
 1125 and ovarian function after stopping GnRH antagonist treatment in goats.
 1126 *Theriogenology*, v.63, p. 83-91, 2005.
- 1127
- 1128 GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCÍA-GARCÍA, R.M.;
 1129 SOUZA, C.J.H.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; MCNEILLY, A.S. Measurement of
 1130 inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory
 1131 FSH treatments. *Theriogenology*. v. 57, p.1263–1272. 2002.
- 1132
- 1133 GOODMAN, R.L.; BITTMAN, E.L.; FOSTER, D.L.; KARSCH, F.J. Alternations
 1134 in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal
 1135 variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biology of Reproduction*.
 1136 v.27, p.580-89, 1982.
- 1137
- 1138 GÜNGÖR, Ö.; PANCARCI, S.M.; ÇENESİZ, M.; BECERİKLİSOY, H.B.;
 1139 KANCA, H. effect of GnRH implant (deslorelin) with different formulation on
 1140 fertility and delay of oestrous cycle in ewes. *Bulletin of the Veterinary Institute in*
 1141 *Pulawy*. v.51, p.25-29, 2007.
- 1142
- 1143 HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri: Manole, 513p,
 1144 2004.
- 1145
- 1146 HEBER, D.; SWERDLOFF, R.S. Dow-regulation of pituitary gonadotropin
 1147 secretion in postmenopausal females by continuous gonadotropin-releasing
 1148 hormone administration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
 1149 v.52, p.171-72, 1981.

- 1150 HOOPER, S.B.; WATKINS, W.B.; THOURBURN, G.D. Oxytocin,
1151 oxytocin-associated neurophysin and prostaglandin F2a concentrations in the
1152 uteroovarian vein of pregnant and non-pregnant sheep. *Endocrinology*. v.119,
1153 p.2590-97, 1986.
1154
- 1155 HUCKLE, W.R.; CONN, P.M. Molecular mechanisms of gonadotropin releasing
1156 hormone action: II. The effector system. *Endocrine Reviews*. v.9, p.387–95,
1157 1988.
1158
- 1159 HUNTER M.G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum.
1160 *Journal of Reproduction and Fertility*. v.43, p.91-99, 1991.
1161
- 1162 JAINNUDEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B.
1163 Reprodução Animal, 7.ed., Manole Ltda: Barueri – SP. p.173-182, 2004.
1164
- 1165 KARSCH, F.J. Endocrine and environmental control of oestrus cyclicity in
1166 sheep. *Reproduction in Sheep*, v.1, p.10-15, 1984.
1167
- 1168 KARTEN, M.; RIVIER, J.E. Gonadotropin-releasing hormone analog design.
1169 Structure–function studies toward the development of agonists and antagonists:
1170 rationale and perspective. *Endocrinology*. v.7, p.44–66, 1986.
1171
- 1172 LEITE, H.R. *Supressão temporária do crescimento folicular ovariano em*
1173 *ovelhas pelo emprego de implantes de liberação continuada de deslorelina*.
1174 2012. 69f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e
1175 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
1176
- 1177 LEYVA V.; BUCKRELL B.C.; WALTON J.S. Regulation of follicular activity and
1178 ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* v.50, p.395-416,
1179 1999.
1180
- 1181 LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocytes secreted
1182 factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells
1183 and cumulus cells. *Biology of Reproduction*. v.63, p.839–45, 2000.

- 1184 LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER,
1185 W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal*
1186 *Science*. v.70, p. 3615-3626,1992.
- 1187
- 1188 LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELI, A.; HUDSON, N.L.; MCNATTY, K.P.
1189 Populations of granulosa cells in small follicles of sheep, *Journal of*
1190 *Reproduction and fertility*. v.115, p.251–62, 1999.
- 1191
- 1192 MARIANA, J.C.; MONNIAUX, D.; DRIANCOURT, M.A.; MAULBORN, P.
1193 Folliculogenesis. In: *Reproduction in Domestic Animals*. 4 ed. (Ed. P. T. Cupps.)
1194 p.119-71. (Academic Press:San Diego.), 1991.
- 1195
- 1196 McCUE, P.M.; FARQUHAR, V.J.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Removal
1197 of deslorelin (Ovuplant®) implant 48h after administration results in normal
1198 interovulatory intervals in mares. *Theriogenology*. v.58, p.865-70, 2002.
- 1199
- 1200 McNATTY, K.P.; BALL, K.; GIBB, M.; DOBSON, C.; BALL, K.; THURLEY, D.C.
1201 Induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes with
1202 exogenous GnRH. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.64, p.93-6, 1982.
- 1203
- 1204 McNATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; READER, K.L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.;
1205 LAWRENCE, S.B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.F.; MOTTERSHEAD,D.
1206 G.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M.P. Bone morphogenetic protein
1207 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell
1208 function. *Reproduction*. v.129, p.473–80, 2005.
- 1209
- 1210 McNATTY, K.P.; MOORE, L.G.; HUDSON, N.L.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE,
1211 S. B.; READE, K.; HANRAHAN, J.P.; SMITH, P.; GROOME, N.P.; LAITINEN,
1212 M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J.L. The oocyte and its role in regulating ovulation
1213 rate: a new paradigm in reproductive *biology*. *Reproduction*. v.128, p.379–86,
1214 2004.
- 1215

- 1216 McNATTY, K.P.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; LUN, S. Follicular
1217 development and steroidogenesis. *Local Regulation of Ovarian Function*. p.21-
1218 38, 1992.
- 1219
- 1220 McNEILLY, A.S.; JONASSEN, J.A.; FRASER, H.M. Supression of follicular
1221 development after LHRH immunoneutralization in the ewe. *Journal of*
1222 *Reproduction and Fertility*. v.76, p.481-90, 1986.
- 1223
- 1224 MCNEILLY, A.S.; PICTON, H.M.; CAMPBELLI, B.K.; BAIRD, D.T.
1225 Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *Journal of Reproduction and*
1226 *Fertility*. v.43, p.177-86, 1991.
- 1227
- 1228 MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A.; MC CONNELL, K.; SPICER,
1229 L.J.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dietary-intake on pattern of growth
1230 of dominant follicles during the estrous-cycle in beef heifers. *Journal of*
1231 *Reproduction and Fertility*, v.92, p.333-38, 1991.
- 1232
- 1233 OLIVEIRA, M.E.F. *Dinâmica folicular, perfil hormonal e viabilidade da*
1234 *superovulação iniciada na emergência da primeira e última ondas foliculares,*
1235 *em ovelhas santa inês, nas estações de ciclicidade, transição e anestro*. 2011.
1236 132F. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
1237 Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- 1238
- 1239 PADULA, A.M. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal*
1240 *Reproduction Science*. v.88, p.115–26, 2005.
- 1241
- 1242 PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Observations on the reproductive effects of
1243 once or twice weekly injections for 6 weeks of the GnRH agonist deslorelin in
1244 the cow. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.223-30, 2005.
- 1245
- 1246 PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Reproductive responses of early postpartum
1247 dairy cattle to continuous treatment with a GnRH agonist (deslorelin) for 28
1248 days to delay resumption of ovulation. *Animal Reproduction Science*, v.70, supl.
1249 1-2, p.23-36, 2002.

- 1250 PICTON, H.M.; TSONIS, C.G.; McNEILLY, A.S. The antagonistic effect of
1251 exogenous LH pulses on FSH-stimulated preovulatory follicle growth in ewes
1252 chronically treated with gonadotrophin releasing hormone agonist. *Journal of*
1253 *Endocrinology*. v.127, p.273-83, 1990.
- 1254
- 1255 RABIN, D.; MCNEIL, L.W. Pituitary and gonadal desensitization after
1256 continuous luteinizing hormone-releasing hormone infusion in normal females.
1257 *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v.51, p.873-76, 1980.
- 1258
- 1259 RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas.
1260 *Simpósio Sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes*, São
1261 Paulo. Anais... São Paulo: FMVZ/USP, 2000.
- 1262
- 1263 RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES, C.; RIVERO, A.; ANDADAMS, G.
1264 P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave
1265 emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* v.47,
1266 p.1479–88. 1997.
- 1267
- 1268 RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S. Estrus response after a short
1269 progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, v.49,
1270 p.356, 1998.
- 1271
- 1272 SÁ, C.O. Manejo reproductivo para intervalo entre partos de oito meses. In: VI
1273 *Simpósio Paulista de Ovinocultura*. p.8-20, 2002.
- 1274
- 1275 SANTOS, J.E.P.; BARTOLOME, J.J.; CERRI, R.L.; JUCHEM, S.O.;
1276 HERNANDEZ, O.; TRIGG, T.; THATCHER, W.W. Effect of a deslorelin implant
1277 in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function
1278 and reproductive performance of lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.61,
1279 suppl.2-3, p.421-35, 2004.
- 1280
- 1281
- 1282

- 1283 SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.A.;
 1284 DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTY,
 1285 K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGER, P.; MONNIAUX, D.; VINOLES, C.; WEBB,
 1286 R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate.
 1287 *Reproduction, Fertility and Development*, v.23, p.444–67, 2011.
- 1288
- 1289 SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.;
 1290 DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; HENDERSON, K.K.M.; MARTIN, G.B.;
 1291 McNATTY, K.P.; McNELLY, A.S.; TSONIS, C.G. A model for follicular selection
 1292 and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and*
 1293 *Development*. v.5, p.459-78, 1993.
- 1294
- 1295 SCHNEIDER, F.; TOMEK, W.; GRÜNDKER, C. Gonadotropin-releasing
 1296 hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology*. v.66, p.
 1297 691-709, 2006.
- 1298
- 1299 SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.;
 1300 TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Ovarian structures during the estrous cycle
 1301 and early pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*, v.49, p.1133-1140, 1993.
- 1302
- 1303 SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological
 1304 and molecular aspects. *Animal Reproduction*. v.2 p.147-60, 2005.
- 1305
- 1306 SOUZA, C.J.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Follicular waves and
 1307 concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the
 1308 luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant.
 1309 *Journal of Endocrinology*. v.156, p.563–72, 1998.
- 1310
- 1311 SQUIRES, E.L.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; KEEFE, T.J.;
 1312 MEYERS, S.A.; FIGUEIREDO, E.; MCCUE, P.M.; JOCHLE, W. Effect of dose
 1313 of GnRH analog on ovulation in mares. *Theriogenology*, v.41, p.757-69, 1994.
- 1314

- 1315 STITCH, K.L.; WENDT, K.M.; BLANCHARD, T.L; BRINSKO, S.P. Effects of a
 1316 new injectable shortterm release deslorelin in foal-heat mares. *Theriogenology*,
 1317 v.62, p.831-36, 2004.
- 1318
- 1319 TAKADA, L. *Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da*
 1320 *ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk.*
 1321 2004, 152f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e
 1322 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- 1323
- 1324 TARAGNAT, C.; BERNIER, A.; FONTAINE, J. Gonadotrophin storage patterns
 1325 in the ewe during the oestrous cycle or after long-term treatment with a GnRH
 1326 agonist. *Journal of endocrinology*. v.156, p.149-57, 1998.
- 1327
- 1328 THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent
 1329 processes? *Journal of Reproduction and Fertility*. v.51, p.1–15, 1977.
- 1330
- 1331 TRIGG, T.E.; WRIGHT, P.J.; ARMOUR, A.F.; WILLIAMSON, P.E.; JUNAIDI, A.;
 1332 MARTIN, G.B.; DOYLE, A.G.; WALSH, J. Use of a GnRH analogue implant to
 1333 produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and
 1334 female domestic dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*., v.57, p.255-61,
 1335 2001.
- 1336
- 1337 TSONIS, C. G.; CAHILL, L. P.; CARSON, R. S.; FINDLAY, J. K. Identification at
 1338 the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe. *Journal of*
 1339 *Reproduction and Fertility*. v.70, p.609-14, 1984.
- 1340
- 1341 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their
 1342 growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. v.
 1343 63, p.1717-51, 2005.
- 1344
- 1345 VIGUIÉ, C.; CARATY, A.; LOCATELLI, A.; MALPAUX, B. Regulation of LHRH
 1346 secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed in LHRH and LH
 1347 pulsatile secretion. *Biology of Reproduction*. v.52, p.1114-20, 1995
- 1348

- 1349 VIÑOLES, C.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Follicular wave pattern and
1350 progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition
1351 score. *Theriogenology*, v.51, p.437, 1999.
1352
- 1353 WEBB, R.; BAXTER, G.; MCBRIDE, D.; RITCHIE, M.; SPRINGBETT, A.J.
1354 Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus.
1355 *Journal of Reproduction and Fertility*. v.94, p.143–51, 1992.
1356
- 1357 WEBB, R.; GAULD, I.K.; DRIANCOURT, M.A. Morphological and functional
1358 characterization of large antral follicle in three breeds of sheep with diferente
1359 ovulation rates. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.87, p.243-55, 1989.
1360
- 1361 WEI, S.; GONG, Z.; DONG, J.; OUYANG, X.; WEI, M.; XIE, K.; QIONGYI L.;
1362 FENG, Z.; JIANLONG, S. Effect of a GnRH agonist on the FSH receptors in
1363 prepubertal ewes. *Small Ruminant Research*. v.105, p. 237-43, 2012.
1364
- 1365 WRIGHT, P.J.; VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; JOCHLE, W.; ARMOUR, A.F.;
1366 MARTIN, G.B.; TRIGG, T.E. Supression of the oestrous responses of bitches to
1367 the GnRH analogue deslorelin by progestin. *Journal of Reproduction and*
1368 *Fertility*. v.57, p.263-68, 2001.
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379

CAPÍTULO 1

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para o periódico “**Theriogenology**”

Normas para publicação disponíveis em:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525024?generatepdf=true

**SUPRESSÃO TEMPORÁRIA DO CRESCIMENTO FOLICULAR
OVARIANO EM OVELHA PELA ADMINISTRAÇÃO CONTINUADA
DE DESLORELINA NA FORMA INJETÁVEL OU IMPLANTE DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Botucatu

2015

RESUMO.

O objetivo do trabalho foi promover supressão do crescimento folicular em ovelhas utilizando implantes com acetato de deslorelina (Suprelorin® 4,7mg – Virbac - USA) e na forma injetável (Sincrorrelin®; 250µg/mL - Ourofino, São Paulo; Brasil) comparando a eficiência dos tratamentos. 22 ovelhas da raça Bergamácia tiveram o estro induzido pelo emprego de dispositivo intravaginal Eazi-Breed CIDR®, (0,33g de progesterona) de segundo uso, por 12 dias e administração única, pela via intramuscular, de 350UI de eCG (Novormon® Intervet Schering-Plough, São Paulo, Brasil) concomitantemente à retirada do dispositivo. Amostras de sangue foram coletadas para confirmação da ovulação por mensuração de progesterona no plasma sanguíneo. As ovelhas foram então divididos em quatro grupos: G0 (Controle): animais sem tratamento; G1 (DES 48h); animais submetidos a aplicações intramusculares de 100µg de deslorelina a cada 48 horas durante sete dias; G2 (DES 72h): animais submetidos a aplicações intramusculares de 100µg de deslorelina a cada 72 horas durante sete dias; e G3 (Implante): animais com implante subcutâneo contendo 4,7mg de deslorelina que permaneceu por sete dias. Durante os sete dias de experimento, os animais, uma vez ao dia, foram monitorados por ultrassonografia para estabelecer a supressão folicular. No G1 (DES 48h) a supressão folicular ocorreu no D6 quando não observamos folículos maiores que 2mm de diâmetro e nos grupos G2 (DES 72h) e G3 (Implante) no D7. Foram observadas três respostas diferente ao tratamento sendo que na maioria dos animais (n=8) ocorreram ovulações de folículos médios e grandes. Quando somada a população de folículos médios e grandes o G1(DES 48h) difere entre os dias do D6 em diante e em relação ao D0 e em relação ao G0 (Controle) do D4 em diante e o G2 (DES 72h) e G3 (Implante) difere do G0 (Controle) do D5 em diante. Evidenciando o decréscimo dos folículos médios e grandes em decorrência da permanência do tratamento com deslorelina. Em todos os tratamentos a deslorelina exerceu efeito de supressão temporária de crescimento folicular não havendo influência da forma de administração ($p>0,05$) sobre o tempo de retorno da atividade ovariana, que em média ocorreu com 12 dias.

Palavras-chaves: Dinâmica folicular; Hormônio liberador de gonadotrofina; Downregulation; Reprodução ovina; Biotecnologia animal; Acetato de deslorelina.

ABSTRACT

The objective was study the temporary suppression of ovarian follicular growth in ewe utilizing deslorelin implants (Suprelorin® 4,7mg – Virbac - USA) and injectable form (Sincrorrelín®; 250µg/mL - Ourofino, São Paulo; Brasil) comparing the efficiency of treatments. 22 Bergamacia ewes had the estrus synchronized with intravaginal device Eazi-Breed CIDR® (0.33g progesterone) for 12 days and a single intramuscular injection, of 350UI eCG (Novormon® Intervet Schering-Plough, São Paulo, Brasil) concurrently with the removal of the device. Blood samples were collected for confirmation of ovulation and cyclicity by measuring plasma progesterone. Ewes was then randomly divided into four groups: G0 (Control): untreated animals; G1 (DES 48h); animals with 100µg deslorelin (IM) every 48 hours for seven days; G2 (DES 72h) animals with 100µg deslorelin (IM) every 72 hours for seven days; and G3 (implant): animals with subcutaneous implant containing 4.7 mg deslorelin which remained for seven days. During the specific treatment period of each group (seven days), the animals ovaries was monitored by ultrasound once a day to establish the suppression of follicular growth. In G1 (DES 48h) follicular suppression occurred in the D6 when not observe follicles larger than 2,9 mm in diameter and G2 (DES 72h) and G3 (Implant) in D7. Three different responses to treatment was observed with the majority of animals (n = 8) occurred ovulation of medium and large follicles. When coupled population of medium and large follicles G1 (DES 48h) differs between days on D6 relative to D0 and relative to G0 (Control) on D4, G2 (DES 72h) and G3 (Implant) differs from G0 (Control) on D5. Evidencing a decrease in medium and large follicles as a result of permanence of the treatment with deslorelin. In all subgroups the deslorelin played the suppression of follicular growth and there is no influence of the form of administration ($p > 0.05$) on the turnaround time of ovarian activity, which on average was 12 days.

Keywords: Follicular dynamics; Gonadotropin-releasing hormone; Down regulation; Sheep reproduction; Animal biotechnology; Deslorelin acetate.

1. Introdução.

Uma limitação para o desenvolvimento de programas de superovulação e transferência de embrião em ovinos e caprinos é a grande variação na resposta do ovário aos estímulos das gonadotrofinas. Isto ocorre porque nem sempre é levado em conta o status de desenvolvimento folicular no início do protocolo de superestimulação [1] Resultados mais regulares são obtidos ao iniciar o tratamento na ausência de folículos dominantes [2].

A ablação de folículos grandes é uma alternativa para melhoria da resposta em ovelhas [3], porém requer o uso de técnica invasiva como a laparoscopia, além de aumentar os procedimentos de manejo [1].

A utilização dos análogos de GnRH, é considerado a principal alternativa para que ocorra uma melhoria na uniformidade da resposta ovariana à protocolos de superovulação em ovelhas, onde pretende-se iniciar após uma fase de quiescência ovariana, e que todos os folículos cresçam de forma similar, livre da excessiva retroalimentação negativa de estrógeno [4,5].

Visando melhorar a resposta aos protocolos de superovulação foi associado o uso de agonistas e antagonistas do GnRH aos progestágenos com o objetivo de suprimir a liberação endógena de gonadotrofinas [6]. Este conceito também foi utilizado em outros estudos de superestimulação ovariana em que foram testados pré-tratamentos com agonistas do GnRH (Busorelina) ou com antagonista (Antarelix) nos quais os autores obtiveram diminuição dos folículos maiores, aumento no número dos folículos menores e consequente aumento na resposta ao FSH exógeno em até 50% [2,7].

Em ratos [8] e mulheres [9] foi observado que após a administração aguda ou crônica de GnRH, ou de seus análogos, há dessensibilização ao seu estímulo e/ou a depleção de LH e FSH na hipófise.

O processo de down regulation provocado pelo GnRH e seus agonistas promove uma dessensibilização dos receptores hipofisários que possivelmente ocorre devido a aceleração da internalização e degradação dos receptores de GnRH, sem que ocorra uma resposta compensatória ou devido ao desacoplamento dos receptores de GnRH ao seu segundo mensageiro intracelular dentro das células gonadotróficas induzindo um efeito transitório de insensibilidade [10,11].

34 Em ovinos após o tratamento com agonista do GnRH a resposta das
35 gonadotrofinas ao GnRH é totalmente abolida, confirmando a dessensibilização
36 atribuídos ao down regulation e a interrupção do sistema de segundo
37 mensageiro [12]

38 O objetivo deste trabalho foi promover a supressão de folículos médios e
39 grandes em ovelhas utilizando acetato de deslorelina na forma de implantes e
40 na forma injetável.

41

42 **2. Materiais e Métodos**

43 *2.1. Animais e desenho experimental*

44 O experimento foi conduzido no período de estação de monta, durante a
45 transição de outono inverno, no Brasil estado de São Paulo latitude de 22°53.
46 Foram utilizadas 22 ovelhas da raça Bergamácia mantidas em regime de
47 confinamento durante todo o estudo. Tiveram o estro e ovulações
48 sincronizados pelo emprego de dispositivo intravaginal de liberação controlada
49 de progesterona (Eazi-Breed CIDR[®]; 0,33g de progesterona; Pfizer; São Paulo;
50 Brasil), por 12 dias e administração única, pela via intramuscular, de 350UI de
51 eCG (Novormon[®]; Intervet Schering-Plough; São Paulo; Brasil)
52 concomitantemente à retirada do dispositivo. A ocorrência das ovulações foi
53 monitorada por ultrassonografia, duas vezes ao dia, até que se observasse a
54 presença do corpo lúteo (CL) e por quantificação de progesterona no plasma
55 seis dias após a ovulação. Os tratamentos foram iniciados após esse período,
56 utilizando deslorelina injetável com concentração de 250µg/mL (Sincrorrelin[®] da
57 Ourofino São Paulo; Brasil) e implantes contendo 4,7mg de deslorelina
58 (Suprelorin[®]; Virbac; USA).

59 As ovelhas foram randomicamente distribuídas entre os grupos assim
60 constituídos: G0 (Controle) – Ovelhas (n=5) sem as aplicações de deslorelina
61 injetável ou implante subcutâneo; G1 (DES 48h) – Ovelhas (n=6) com a
62 aplicação de 100µg de deslorelina injetável, pela via intramuscular, em
63 intervalos de 48 horas durante sete dias; G2 (DES 72h) – Ovelhas (n=5) com a
64 aplicação de 100µg de deslorelina injetável pela via intramuscular, em

65 intervalos de 72 horas durante sete dias; G3 (Implante) – Ovelhas (n=6) com
66 implante subcutâneo contendo 4,7mg de deslorelina por sete dias.

67 2.2 Metodologias

68 2.2.1 Acompanhamento da atividade ovariana.

69 Durante os sete dias de tratamento foram realizados um exame ao dia
70 utilizando-se ultrassonografia modo – B (Prosound 2 VET; Aloka Co. Ltda;
71 Japão) equipado com transdutor linear 7,5 MHz (Modelo UST-660-7.5; Aloka
72 Co. Ltda; Japão), sendo formadas imagens dos ovários que foram desenhadas
73 em esquemas bidimensionais e os dados das mensurações mapeados de
74 maneira a permitir a identificação e acompanhamento das estruturas durante
75 os dias subsequentes.

76 2.2.2. Critérios utilizados na avaliação ultrassonográfica

77 a) Critérios para a classificação dos folículos

78 Após a determinação do diâmetro, pela média de duas medidas, os
79 folículos foram agrupados em três classes como se segue: Folículo pequeno
80 (diâmetro de 2 a 2,9mm), Folículo médio (diâmetro de 3 a 4,4mm) e Folículo
81 grande (diâmetro $\geq 4,5$ mm).

82 b) Caracterização da supressão do crescimento folicular

83 A supressão do crescimento folicular após o tratamento foi evidenciada
84 na população de folículos médios e grandes, pela ocorrência de ovulação,
85 luteinização ou atresia, sem o reaparecimento de folículos dessas classes.

86 A confirmação da ovulação foi estabelecida através do
87 acompanhamento da evolução final do folículo em exames consecutivos,
88 considerando como ovulação a não constatação do folículo pré-ovulatório no
89 exame subsequente com posterior visualização do CL na região
90 correspondente do mesmo ovário.

91 A luteinização foi caracterizada pelo desenvolvimento anormal, acima de
92 10 mm de diâmetro, do maior folículo, sendo seu conteúdo preenchido
93 gradativamente por trabéculas e finalizando com formação de estrutura
94 hipercóica similar ao CL.

95 Atresia folicular foi marcada pela estagnação temporária no
96 desenvolvimento de um determinado folículo com diminuição subsequente de
97 seu diâmetro, até seu completo desaparecimento.

98 O retorno do crescimento folicular foi caracterizado naquelas ovelhas
99 que possuíam folículos ovarianos pequenos ao final do tratamento, pelo
100 reaparecimento de folículos médios com diâmetro entre 3 a 4,4mm e naquelas
101 sem nenhum folículo ovariano ao final do tratamento pela constatação do
102 primeiro folículo maior que 2mm de diâmetro.

103 O retorno da ciclicidade após a retomada do crescimento folicular foi
104 estabelecido pela ocorrência de manifestações estrais e constatação da
105 primeira ovulação, com confirmação da funcionalidade do CL, pela
106 quantificação da progesterona seis dias pós-ovulação.

107 2.2.3. Confirmação da funcionalidade do corpo lúteo.

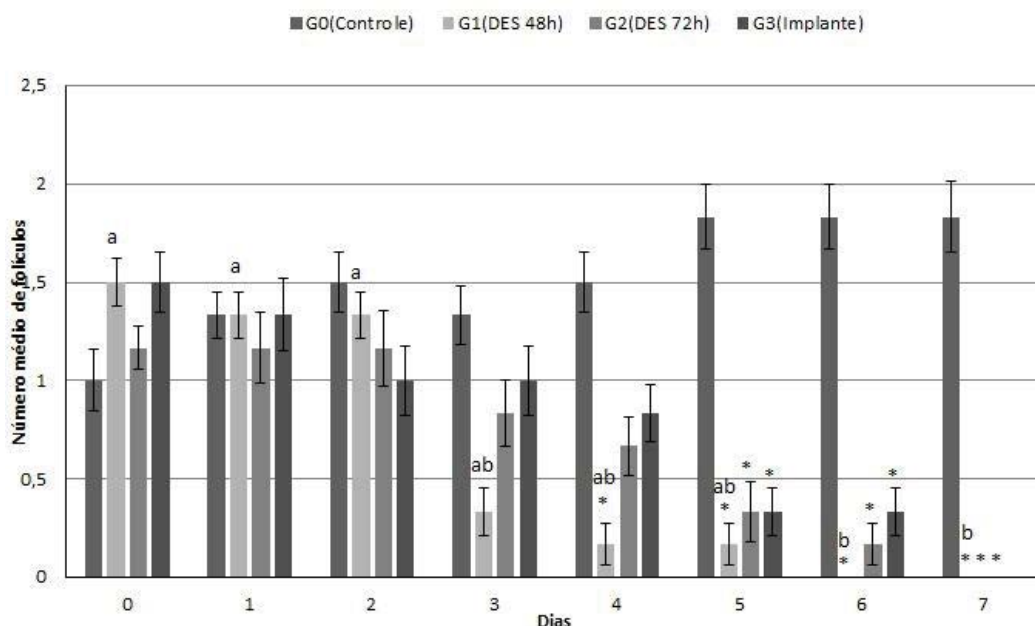
108 A Confirmação da funcionalidade do corpo lúteo foi dada através de
109 quantificação de progesterona no plasma sanguíneo. As amostras de sangue
110 foram obtidas por venopunção jugular. As quantificações de progesterona
111 foram realizadas utilizando kits comerciais (RIA Progesterone; Beckman
112 Coutler; Praga) e contador gama automatizado (Automatic Gamma Counter
113 Perkin Elmer Wizard 1470; USA) sendo os dados expressos em ng/mL. Valores
114 de progesterona iguais ou superiores a 1 ng/mL foram considerados indicativos
115 de atividade luteal.

116 2.2.4. Análise Estatística.

117 Foi realizada a análise estatística pelo teste não paramétrico Kruskal-
118 Wallis, seguido do teste de Dunn para as comparações das médias,
119 estabelecendo como nível de significância $\alpha=0,05$. Empregou-se o programa
120 GraphPad Prism[®], versão 5.03 para Windows.

121 3. Resultados.

122 Para demonstrar o efeito supressivo sobre o crescimento folicular ao
123 longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina, as classes de
124 folículos médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm), classes alvo do trabalho,
125 foram agrupadas gerando dados de média e erro padrão (Fig.1).



Distintas letras minúsculas (a,b) indicam diferença na população de folículos durante os dias no G1(DES 48h) ($p < 0,05$)

Diferença ($p < 0,05$) na população de folículos entre os grupos durante os dias são indicados por (*)

FIGURA 1 - Número médio e erro padrão do agrupamento de folículos médios (3 a 4,4mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) nos grupos G0 (Controle), G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante), distribuídos ao longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina em ovelhas Bergamácia.

O G0 (Controle) diferiu do G1 (DES 48h) nos dias D4 ($1,5 \pm 0,2$ vs $0,2 \pm 0,1$), D5 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,2 \pm 0,1$), D6 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,0 \pm 0,0$) e D7 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,0 \pm 0,0$)

Do G2 (DES 72h) no D5 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,3 \pm 0,2$), D6 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,2 \pm 0,1$) e D7 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,0 \pm 0,0$); e

Do G3 (Implante) no D5 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,3 \pm 0,1$), D6 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,3 \pm 0,1$) e D7 ($1,8 \pm 0,2$ vs $0,0 \pm 0,0$).

No G1 (DES 48h) a soma das classes de folículos médios e grandes diferenciou do D6 em diante em relação ao D0, evidenciando-se decréscimo, da população folicular em decorrência do tratamento com quatro aplicações de deslorelina, intervaladas de 48 horas.

Do D6 em diante não observamos folículos médios e grandes no G1 (DES 48h) e no D7 para o G2 (DES 72h) e G3 (Implante).

A tab.1 demonstra o comportamento ovariano das ovelhas após o início do tratamento. Foram observadas três respostas diferentes, a qual 47,1% das ovelhas apresentaram ovulações, 29,4% apresentaram luteinização e 23,6% das ovelhas os folículos regrediram e não cresceram ao decorrer do experimento. No Grupo controle não foi observado nenhum desses fenômenos.

153 TABELA 1 - Resposta ovariana, após início dos tratamentos com acetato de deslorelina
 154 durante e após 48 horas nos grupos G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante) em relação
 155 às ovulações, luteinizações e atresias ocorrida nos folículos de ovelhas Bergamácia atribuídas
 156 ao efeito do fármaco.

Resposta	G1 (DES 48h)			G2 (DES 72h)			G3 (implante)			TOTAL	
	24h	48h	>48h	24h	48h	>48h	24h	48h	>48h	n	%
Ovulações	1	0	3	1	0	1	0	1	1	8	47,1
Luteinizações	0	0	2	0	0	1	0	0	2	5	29,4
Atresias	0	0	0	0	0	2	0	1	1	4	23,6

157 Em G0 (Controle) nenhuma ocorrência de ovulação, luteinização ou atresia.

158 Na Tab.2 são apresentados os tempos decorridos para supressão dos
 159 folículos médios e grandes e retorno do crescimento folicular, não havendo
 160 diferença ($p>0,05$) entre os grupos de tratamentos.

161 TABELA 2: Tempo médio $\pm$ desvio padrão em dias para os grupos G1 (DES 48h), G2 (DES
 162 72h) e G3 (Implante) para o retorno da atividade cíclica (Supressão dos folículos médios e
 163 grandes e o tempo do retorno do crescimento folicular após a interrupção do tratamento),
 164 segundo tratamento com acetado de deslorelina.

Grupo	Supressão Fol. Médio e Grandes		Retorno crescimento folicular	
	Tempo (dia)	Nº / Total*	Tempo (dia)	Nº/ Total*
G1 (DES 48h)	4,0 $\pm$ 1,9	6/6	3,8 $\pm$ 0,8	6/6
G2 (DES 72h)	4,2 $\pm$ 2,2	5/5	2,4 $\pm$ 0,5	5/5
G3 (Implante)	4,1 $\pm$ 1,8	6/6	3,3 $\pm$ 2,0	6/6

165 *Número total de animais por subgrupos.

166 No G0 (Controle) não ocorreu supressão folicular
 167 ($p>0,05$)
 168

169 Na Tab.3 são apresentados os tempos decorridos entre o retorno do
 170 crescimento folicular e ocorrência de ovulação e o tempo entre a interrupção do
 171 tratamento e a ocorrência da ovulação, não havendo diferença ($P>0,05$) entre
 172 os grupos tratamento.

173 TABELA 3: Tempo médio $\pm$ desvio padrão em dias dos grupos G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e
 174 G3 (Implante) para ocorrência das ovulações (Ovulação relacionada com retorno do
 175 crescimento folicular e ovulação relacionada com a interrupção do tratamento).

Grupo	Ret. Do crescimento*/ovulação	Interrupção do Trat/ovulação	Nº Ovulação/ Nº Total**
G1	8,1 $\pm$ 2,9	12 $\pm$ 3,5	6/6
G2	8,4 $\pm$ 3,5	10 $\pm$ 3,4	5/5
G3	9 $\pm$ 1,6	12 $\pm$ 3,2	6/6

176 *Retorno do crescimento folicular.

177 ** Número de animais que ovularam/ Número total de animais por grupo
 178 ($P>0,05$)

179 Não foram constatadas reações adversas nos locais de colocação dos
180 implantes e de aplicações de acetato de deslorelina.

181

182 4. Discussão.

183 No presente trabalho, o uso do acetado de deslorelina tanto na forma de
184 implante quanto na forma injetável, promoveu supressão dos folículos médios e
185 grandes em todas as ovelhas, podendo ser observado na Fig.1 o decréscimo
186 das classes de folículos médios e grandes, com o passar do tempo sob a
187 influência desse agonista de GnRH. Assim como já foi demonstrado em
188 bovinos. Estudo realizado com novilhas mestiças de Zebu com implantes
189 contendo quantidades crescentes de deslorelina suprimiram o crescimento
190 folicular ovariano, ovulação e concepção de modo dose-dependente por até 12
191 meses [13].

192 Em relação ao Controle (G0) a diferença ($p < 0,05$) aparece no quarto dia
193 do tratamento (D4) para o G1 (Des 48h) e no quinto dia (D5) para o G2 (DES
194 72h) e G3 (Implante). Somente em G1 (DES 48h) demonstrou-se diferença no
195 agrupamento de folículos médios e grandes ao longo dos dias quando
196 comparado com ele mesmo, demonstrando um comportamento melhor e mais
197 homogêneo que os demais grupos, sugerindo um melhor efeito supressivo
198 desse tratamento. O menor intervalo de aplicação nesse grupo provavelmente
199 está promovendo um estímulo melhor e mais uniforme que nos demais grupos.
200 Como demonstrado em outros trabalhos com bovinos o aumento da
201 concentração do agonista promove uma resposta mais rápida [13].

202 A ação da deslorelina, além da atresia folicular, foi promover ovulações e
203 luteinizações de folículos classificados como médios e grandes. A ovulação de
204 folículos médios e grandes pode ser explicada porque os folículos
205 potencialmente ovulatórios, são aqueles que adquirem receptores de LH e
206 secretam grandes quantidades de estradiol sendo capaz de ovular dado o
207 ambiente endócrino de estradiol alto, progesterona baixa e alta frequência do
208 pulso de LH [14], o que foi promovido inicialmente com o tratamento. Com isso
209 evidenciou-se o alto potencial do acetato de deslorelina em promover
210 ovulações em folículos médios e grandes.

211 No tratamento crônico com agonistas do GnRH a primeira característica
212 é um imediato aumento nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas,
213 estimulando o crescimento folicular e indução da ovulação [13,15].

214 Foi demonstrado que o efeito supressivo da atividade folicular ovariana,
215 em animais tratados em longo prazo com o agonista do GnRH, é devido a
216 insuficiência da gonadotrofina, em vez da ação direta do agonista nos ovários
217 [16], pois a exposição prolongada conduz a uma fase crônica durante a qual a
218 secreção pulsátil de LH é bloqueada [17]. A falta de secreção pulsátil de LH, e
219 provavelmente FSH, é mantida durante o tempo que agonista de GnRH esta
220 presente na circulação, a uma concentração limiar [17] e como consequência a
221 falta de gonadotrofinas inibe o desenvolvimento folicular [18]. O fato de os
222 tratamentos serem realizados de forma aguda (sete dias) no presente estudo
223 impossibilita observar esse evento e ocorre um retorno mais rápido da
224 atividade cíclica porque na maioria das ovelhas foi observada a presença de
225 folículos pequenos ao final do tratamento.

226 Quanto ao retorno do crescimento folicular não foi observado diferença
227 significativa entre os grupos tratamentos como demonstrado na tab.2 e assim
228 como em outros trabalhos as ovelhas voltaram a ciclar logo após a retirada do
229 estímulo [19]. O acetato de deslorelina provocou a supressão folicular e
230 sincronizou o início de uma nova onda.

231 Tem-se sugerido que quando o primeiro pico pré-ovulatório de LH é
232 induzido, os grandes folículos nem sempre estão maduros a ponto de
233 desenvolver um corpo lúteo normal [20]. No presente estudo, isso não foi
234 observado, visto que em todos os animais foram feitas análises para
235 quantificação de progesterona após a primeira ovulação e obtidos valores
236 acima de 1 ng/mL.

237 O presente estudo prova o efeito supressivo do acetato de deslorelina.
238 Autores relatam a idéia de que o tratamento superestimulatório iniciado na
239 ausência de folículos dominantes resulta no melhor recrutamento folicular,
240 taxas de ovulação e produção de embriões [21–23].

241 Com isso existe a hipótese de que se os achados encontrados no
242 presente estudo forem aliados com a utilização dos protocolos de
243 superovulação, aumentara a sua eficiência, por fornecer o momento ideal para
244 a atuação do FSH exógeno.

245 Em ovelhas o tratamento com agonista do GnRH aumenta
 246 significativamente o número de folículos pequenos e consequentemente
 247 melhora resposta da superestimulação ovariana ao fazer a supressão de
 248 folículos médios e grandes, melhora a resposta ovulatória e aumenta a
 249 quantidade sem afetar a qualidade dos embriões transferíveis por ovelha [2]. O
 250 aumento no número de folículos menores pode ser atribuído a supressão de
 251 folículos maiores que 4mm e por consequência uma diminuição nos níveis de
 252 inibina A [1].

253 Baseado nos resultados obtidos o momento ideal para o início da
 254 superovulação no G1 seria no sexto dia de tratamento e no G2 e G3 o sétimo
 255 dia , pois não há presença de folículos médios e grandes (Fig.1).

256

257 5. Conclusão.

258 Tanto o implante subcutâneo de liberação continuada de acetato de
 259 deslorelina, quanto às aplicações seriadas promovem a supressão do
 260 crescimento folicular ovariano, pela ocorrência de ovulação, luteinização ou
 261 atresia dos folículos médios e grandes com aumento do número de estrutura
 262 lúteas.

263 A supressão ocorre de forma mais homogênea com quatro aplicações
 264 intervaladas de 48 horas

265 Após a suspensão do tratamento com deslorrelina ocorre sincronização de
 266 uma nova onda de crescimento folicular que resulta em ovulações e formação
 267 de CL funcional. Não há diferença entre os tratamentos quanto aos tempos de
 268 retorno do crescimento folicular e ocorrência de ovulação.

269

270 6. Referências.

- 271 [1] Gonzalez-Bulnes A, Lopez-Sebastian A, Garcia-Garcia RM, Veiga-Lopez
 272 A, Souza CJH, McNeilly AS. Restoration of endocrine and ovarian
 273 function after stopping GnRH antagonist treatment in goats.
 274 Theriogenology 2005;63:83–91.
 275 doi:10.1016/j.theriogenology.2004.03.019.
- 276 [2] Gharbi I, Ferrouk M, Dechicha A, Baril G, Beckers JF, Guetarni D.
 277 Follicular Status and Embryo Production in Ouled Djellal (Algeria) Ewes
 278 Breed Pretreated with a GnRH Agonist. Asian J Anim Vet Adv
 279 2012;7:117–27. doi:10.3923/ajava.2012.117.127.

- 280 [3] González-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, García-García
281 RM, Inskeep EK, et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple
282 ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*
283 2004;16:421–35. doi:10.1071/RD04033.
- 284 [4] McNeilly AS, Picton HM, Campbell BK, Baird DT. Gonadotrophic control
285 of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;43:177–86.
- 286 [5] Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*,
287 vol. 51, 1999, p. 105–16. doi:10.1016/S0093-691X(98)00235-0.
- 288 [6] Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo
289 technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003;59:171–88.
290 doi:10.1016/S0093-691X(02)01270-0.
- 291 [7] Dufour JJ, Cognié Y, Mermillod P, Mariana JC, Romain RF. Effects of the
292 Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated
293 Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil*
294 2000;118:85–94. doi:10.1530/reprod/118.1.85.
- 295 [8] CLAYTON RN. Gonadotropin-Releasing Hormone Modulation of Its Own
296 Pituitary Receptors: Evidence for Biphasic Regulation*. *Endocrinology*
297 1982;111:152–61. doi:10.1210/endo-111-1-152.
- 298 [9] HEBER D, SWERDLOFF RS. Down-Regulation of Pituitary Gonadotropin
299 Secretion in Postmenopausal Females by Continuous Gonadotropin-
300 Releasing Hormone Administration*. *J Clin Endocrinol Metab*
301 1981;52:171–2. doi:10.1210/jcem-52-2-171.
- 302 [10] HUCKLE WR, CONN PM. Molecular Mechanism of Gonadotropin
303 Releasing Hormone Action. II. The Effector System*. *Endocr Rev*
304 1988;9:387–95. doi:10.1210/edrv-9-4-387.
- 305 [11] Schneider F, Tomek W, Gründker C. Gonadotropin-releasing hormone
306 (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology*
307 2006;66:691–709. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.025.
- 308 [12] Taragnat C, Bernier a., Fontaine J. Gonadotrophin storage patterns in the
309 ewe during the oestrous cycle or after long-term treatment with a GnRH
310 agonist. *J Endocrinol* 1998;156:149–57. doi:10.1677/joe.0.1560149.
- 311 [13] D'Occhio M., Fordyce G, Whyte T., Aspden W., Trigg T. Reproductive
312 responses of cattle to GnRH agonists. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:433–
313 42. doi:10.1016/S0378-4320(00)00078-6.
- 314 [14] Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt M a., Dupont J,
315 Fortune JE, et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of
316 ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:444–67.
317 doi:10.1071/RD09161.

- 318 [15] Wei S, Gong Z, Dong J, Ouyang X, Wei M, Xie K, et al. Effect of a GnRH
319 agonist on the FSH receptors in prepubertal ewes. *Small Rumin Res*
320 2012;105:237–43. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.02.014.
- 321 [16] D'Occhio MJ, Sudha G, Jillella D, Whyte T, Maclellan LJ, Walsh J, et al.
322 Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection
323 of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH:
324 A new model for superovulation. *Theriogenology* 1997;47:601–13.
325 doi:10.1016/S0093-691X(97)00018-6.
- 326 [17] D'Occhio MJ, Aspden WJ. Characteristics of luteinizing hormone (LH) and
327 testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone
328 (LHRH), and reproductive function in young bulls receiving the LHRH
329 agonist deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. *Biol*
330 *Reprod* 1996;54:45–52. doi:10.1095/biolreprod54.1.45.
- 331 [18] Padula a M. GnRH analogues--agonists and antagonists. *Anim Reprod*
332 *Sci* 2005;88:115–26. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.05.005.
- 333 [19] Crowder ME, Herring RD, Nett TM. Rapid recovery of gonadotroph
334 function after down-regulation of receptors for GnRH in ewes. *J Reprod*
335 *Fertil* 1986;78:577–85. doi:10.1530/jrf.0.0780577.
- 336 [20] Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum.
337 *J Reprod Fertil Suppl* 1991;43:91–9.
- 338 [21] Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams GP. Ovarian
339 response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence
340 in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 1997;47:1479–
341 88. doi:10.1016/S0093-691X(97)00155-6.
- 342 [22] D'Occhio MJ, Cremonesi F, Trigg TE, Aspden WJ, Baruselli PS. Acute
343 follicular response to FSH in heifers downregulated long term with a
344 GnRH agonist and with suppressed ovarian follicular growth.
345 *Theriogenology* 2013;80:999–1005.
346 doi:10.1016/j.theriogenology.2013.07.028.
- 347 [23] Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero M., Souza CJ., Groome
348 N., Garcia-Garcia R., et al. Measurement of inhibin A and follicular status
349 predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments.
350 *Theriogenology* 2002;57:1263–72. doi:10.1016/S0093-691X(01)00723-3.

351

Anexo 1: Número médio de folículos nos grupos experimentais G0 (Controle; n=5), G1 (Des 48h; n=6), G2 (Des 72h; n=5) e G3 (Implante; n=6), distribuídos nas classes pequenos (2 a 2,9 mm), médios (3 a 4,5mm) e grandes ($\geq 4,5$ mm) nos sete dias em que ocorreram os tratamentos em ovelhas Bergamácia.

GRUPO	Dia do tratamento	Média de folículos pequenos	Média de folículos médios	Média de folículos grandes
G0 (Controle)	D0	1,7	0,3	0,7
	D1	1,3	1,0	0,3
	D2	1,8	1,0	0,5
	D3	2,0	0,5	0,8
	D4	1,7	0,7	0,8
	D5	1,5	1,5	0,3
	D6	1,5	1,5	0,3
	D7	1,7	1,3	0,5
G1 (DES 48h)	D0	0,5	1,2	0,3
	D1	0,8	0,7	0,7
	D2	0,5	0,5	0,8
	D3	0,5	0,3	0,0
	D4	0,2	0,2	0,0
	D5	0,7	0,2	0,0
	D6	0,5	0,0	0,0
	D7	0,3	0,0	0,0
G2 (DES 72h)	D0	0,8	0,7	0,5
	D1	0,8	0,8	0,3
	D2	0,3	0,8	0,3
	D3	0,5	0,5	0,3
	D4	0,8	0,7	0,0
	D5	1,2	0,3	0,0
	D6	1,0	0,2	0,0
	D7	0,7	0,0	0,0
G3 (Implante)	D0	0,7	1,0	0,5
	D1	1,0	0,5	0,8
	D2	0,7	0,3	0,7
	D3	0,5	0,0	1,0
	D4	0,0	0,5	0,3
	D5	0,5	0,2	0,2
	D6	0,2	0,2	0,2
	D7	0,2	0,0	0,0

Anexo 2: Número médio da somatória de folículos médios (3 a 4,5mm) e grandes ($\geq 4,5\text{mm}$) nos grupos G0 (Controle), G1 (DES 48h), G2 (DES 72h) e G3 (Implante), distribuídos ao longo dos sete dias de tratamento com acetato de deslorelina em ovelhas Bergamácia.

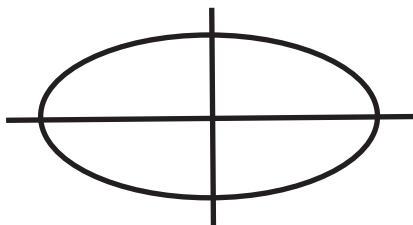
GRUPO	Dia do tratamento	Média da somatória dos folículos médios e grandes
G0 (Controle)	D0	1,0
	D1	1,3
	D2	1,5
	D3	1,3
	D4	1,5
	D5	1,8
	D6	1,8
	D7	1,8
G1 (DES 48h)	D0	1,5
	D1	1,3
	D2	1,3
	D3	0,3
	D4	0,2
	D5	0,2
	D6	0,0
	D7	0,0
G2 (DES 72h)	D0	1,2
	D1	1,2
	D2	1,2
	D3	0,8
	D4	0,7
	D5	0,3
	D6	0,2
	D7	0,0
G3 (Implante)	D0	1,5
	D1	1,3
	D2	1,0
	D3	1,0
	D4	0,8
	D5	0,3
	D6	0,3
	D7	0,0

Anexo 3: Modelo mapeamento folicular

ID _____

GRUPO: _____

OE



OD

