



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

João Bosco Loliola Filho

**EFEITO DA DOSE DE pFSH NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE  
EMBRIÕES EM OVELHAS DORPER PERTENCENTES A DUAS  
CATEGORIAS DE PESO CORPORAL**

Petrolina – PE  
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

João Bosco Loiola Filho

**EFEITO DA DOSE DE pFSH NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE  
EMBRIÕES EM OVELHAS DORPER PERTENCENTES A DUAS  
CATEGORIAS DE PESO CORPORAL**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mabel Freitas Cordeiro.

Petrolina – PE  
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Folha de Aprovação

João Bosco Loiola Filho

**EFEITO DA DOSE DE pFSH NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE  
EMBRIÕES EM OVELHAS DORPER PERTENCENTES A DUAS  
CATEGORIAS DE PESO CORPORAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São  
Francisco.

---

Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior  
Professor Adjunto – Colegiado de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Prof. Dr. Raimundo Campos Palheta Júnior  
Professor Adjunto – Colegiado de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Prof. Dra. Elenice Andrade Moraes  
Professora Adjunta – Colegiado de Zootecnia  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina, 25 de Janeiro de 2013.

*Perguntaram ao Dalai Lama:*

*-O que mais te surpreende na humanidade?*

*E ele respondeu:*

*-Os homens... Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem dinheiro para recuperar a saúde.*

*E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o*

*presente nem o futuro.*

*E vivem como se nunca fossem morrer...*

*...e morrem como se nunca tivessem vivido.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha existência e por colocar em minha jornada, sempre, pessoas maravilhosas e excelentes profissionais, bem como por, a cada conquista, aumentar a quantidade de pessoas que têm me ajudado e aos muitos amigos que tenho feito nessa minha longa caminhada de vida.

À minha mãe, que sempre me ajudou em tudo. Sempre esteve me apoiando, me dando muito carinho e dedicação.

Ao meu irmão, pelo companheirismo, amizade e aos momentos de descontração que vivemos.

Ao meu Pai, que infelizmente não está presente fisicamente, mas com certeza, está me protegendo e me guiando de lá de cima.

Aos meus familiares, pela compreensão, momentos de felicidade e ensinamentos de vida, em especial aos meus avós.

Ao grande amor de minha vida, Gislaine, que teve paciência e me apoiou com toda compressão e esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis. Te amo.

Ao meu orientador Professor Doutor Edilson Soares Lopes Júnior, com quem tenho aprendido muito, principalmente como ser um excelente profissional do ensino. Agradeço a todas as oportunidades que me proporcionou, orientações e conselhos. Muito obrigado!

À Professora Mabel, que também contribuiu muito para meu crescimento profissional, que ajudou a me acalmar e não desistir nos momentos difíceis.

Aos amigos e ICs do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal - LAFIBRA, Celso, Thaís, Adriano (indiozinho), Ana Arlete,

Jonathan, Aionne, pelo grande apoio e amizade. Vocês foram de fundamental importância para a realização desta dissertação.

Às minhas amigas do Mestrado e do LAFIBRA, Mayara, Lívia e Alane, pelo apoio, amizade e, principalmente, por dividirem o peso e a responsabilidade da condução dos experimentos.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pelo maravilhoso e produtivo Curso de Pós-graduação *stricto sensu*, Mestrado em Ciência Animal (CPGCA), que me amadureceu como profissional.

Aos professores do CPGCA, pelo amplo conhecimento passado nas diversas áreas, o que tornou possível um aproveitamento intenso do curso.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE, órgão de fomento de pesquisa que me concedeu a bolsa para realização do mestrado e financiou o meu projeto de pesquisa.

Aos pesquisadores Dr. Tadeu Vinhas Voltolini, Dra. Salete Alves de Moraes, Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo e Dr. Daniel Maia Nogueira, que foram meus primeiros mestres e que plantaram a “semente” da pesquisa em minha cabeça.

Ao amigo Carlos Alanis Clemente, que me ajudou no experimento quando foi possível.

Ao grande amigo Thiago Vinicius Costa Nascimento, pela amizade e pela indicação de meu nome como candidato à seleção de mestrado.

À Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, pela disponibilização dos animais e da estrutura para a realização do meu experimento e, principalmente, pelo apoio de seus funcionários, Osvaldo, Rodrigo, Armando, Glêdson e Rubinho.

À José Hugo, agrônomo da EBDA, que me ajudou em tudo e não mediu esforços para isso, e ao me passar diversos ensinamentos que adquiriu com sua experiência. Muito obrigado!

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste objetivo.

**MUITO OBRIGADO!!!**

## RESUMO

O fator dose de pFSH é de grande relevância na obtenção de respostas superovulatórias homogêneas. Diversos estudos vêm demonstrando que doses de pFSH muito altas ou muito baixas durante o tratamento superovulatório podem causar uma diminuição na quantidade de embriões transferíveis. Portanto, este trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito da dose de pFSH na produção *in vivo* de embriões de ovelhas da raça Dorper exploradas no semiárido do Nordeste do Brasil, foram utilizadas 40 fêmeas. Estas foram distribuídas em dois grupos com 20 animais, de acordo com a categoria de peso (L- grupo leve e P- grupo pesado) e cada grupo foi dividido ao acaso em dois subgrupos de 10 animais, de acordo com o tratamento superovulatório proposto: Grupos L-200 e P-200 receberam 200 mg de pFSH (Folltropin-V®, Vetrepharm, Canada), enquanto os Grupos L-128 e P-128 totalizaram 128 mg. Após sincronização de estro com o CIDR-G durante 14 dias, foi realizada a detecção, a cada quatro horas, utilizando dois carneiros Dorper, de fertilidade comprovada. As ovelhas foram cobertas no início do estro e 24 horas depois. Sete dias após a retirada do dispositivo intravaginal, foi realizada a colheita de embriões pelo método de laparotomia e avaliação da resposta superovulatória. O lavado recuperado foi submetido à procura de embriões em estereomicroscópio e classificados de acordo com sua qualidade. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida da realização do teste Tukey. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Qui-quadrado. O número de ovulações foi superior no grupo P-200, com média de  $17,6 \pm 5,78$  corpos lúteos (CL), quando comparado ao grupo L-128, com média de  $9,30 \pm 4,42$  CL ( $P < 0,05$ ). Quando agrupamos os grupos de acordo com o peso, independentemente da dose, não houve diferença entre os animais pesados e leves quanto à resposta estral e superovulatória ( $P > 0,05$ ). Entretanto, ao agrupar os resultados de acordo com a dose de pFSH, independente do peso dos animais, foi observada diferença entre os animais tratados com 200 ou 128 mg ( $P < 0,05$ ). O número médio ( $\pm$  d.p.) de estruturas colhidas e momento do início do estro observado foram de  $9,84 \pm 4,60$  vs.  $7,08 \pm 3,45$ ;  $15,60 \pm 2,56$  vs.  $17,40 \pm 3,02$  para os animais que receberam 200 ou 128 mg, respectivamente. Entretanto, esta diminuição no número de estruturas colhidas não afetou a produção de embriões transferíveis e congeláveis, demonstrando que é viável a redução da dose de pFSH para 128 mg.

**Palavras - chave:** Biotecnologia, MOTE, ovino, reprodução, superovulação.

## ABSTRACT

The dose of pFSH factor is of great importance in obtaining homogeneous superovulatory responses. Several studies have demonstrated that high or low doses of pFSH during the superovulatory treatment may cause a decrease in the amount of transferable embryos. Therefore, this study aims to evaluate the effect of dose pFSH on in vivo embryo production of Dorper ewes explored in semiarid northeastern Brazil, 40 females were used. These were allocated into two groups with 20 animals, according to body weight category (L - light group and P - heavy group) and each group was randomly allocated into two subgroups of 10 animals according to the superovulatory treatment proposed: L-200 and P-200 Groups received 200 mg of pFSH (Folltropin-V®, Vetrepfarm, Canada), whereas L-128 and P-128 Groups amounted to 128 mg. After estrus synchronization with CIDR-G for 14 days, estrus detection was performed every four hours using two Dorper rams of proven fertility. The ewes were mated at the beginning of estrus and 24 hours later. Seven days after intravaginal device removal, it was performed the embryo recovery using the laparotomy as embryo recovery method and evaluation of superovulatory response. Using a stereomicroscope, the recovered flushing was submitted to embryo research and the embryos were classified according to their quality. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. To compare the several parameters, we used Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey test. The data expressed as percentage were subjected to Chi-square test. The number of ovulations was higher in the P-200, with a mean of  $17.6 \pm 5.78$  corpora lutea (CL), compared to group L-128, with a mean of  $9.30 \pm 4.42$  ( $P < 0.05$ ). When we grouped the groups according to weight, regardless of dose, there was no difference between heavy and light animals for response and superovulatory estrous ( $P > 0.05$ ). However, meeting the results according to pFSH dose, regardless of weight of the animals, it was observed difference between the animals treated with 200 or 128 mg ( $P < 0.05$ ). The mean number ( $\pm$  SD) of recovered structures and time of estrus onset were  $9.84 \pm 4.60$  vs.  $7.08 \pm 3.45$ ,  $15.60 \pm 2.56$  vs.  $17.40 \pm 3.02$  for the animals that received 200 or 128 mg, respectively. However, this decreasing at number of recovered structures did not affect the transferable and freezable embryo production, demonstrating that it is feasible to reduce the pFSH dose to 128 mg.

**Key words:** Biotechnology, MOET, reproduction, sheep, superovulation.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>FIGURA 1. Coleta cirurgica de Embriões. <b>A-</b> conteção do animal e local de incisão; <b>B-</b> exteriorização do trato reprodutivo e realização da contagem dos corpos lúteos; <b>C-</b> lavagem do útero.....</p>	26
<p>Figura 2. Delineamento experimental, exibindo as ovelhas de até 49 kg de peso vivo (Grupo Leve – L; n = 20) ou acima de 49 kg de peso vivo (Grupo Pesado – P; n = 20), bem como os animais superovulados com 128 mg de pFSH (Grupos P-128 e L-128; n = 10, cada) e ovelhas superovuladas com 200 mg de pFSH (Grupos P-200 e L-200; n = 10, cada).....</p>	42

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Qualidade embrionária e suas respectivas características (ROBERTSON & NELSON 2010).....	27
Tabela 2. Produção de corpos lúteos e embriões, de ovelhas merino tratadas com o Protocolo do Dia 0, comparado ao protocolo Tradicional de superovulação (Adaptado de MENCHACA et al., 2009).	31
Tabela 3. Produção média de corpos lúteos (CLs), do total de embriões e de embriões transferíveis em diversos experimentos.....	32
Tabela 4. Efeito da eCG associada ao tratamento com FSH (aplicada na remoção do CIDR) sobre a resposta ovariana e produção de embriões em ovinos (Adaptado de MENCHACA et al., 2009).....	36
Tabela 5. Resultados médios de experimentos que testaram diferentes níveis de pFSH na superovulação de ovelhas.....	38
Tabela 6. Resposta estral e ovariana de ovelhas Dorper, divididas em duas categorias de peso (Leve – L e Pesado – P) e tratadas com 200 (L-200 e P-200) ou 128 mg (L-128 e P-128) de pFSH.....	47
Tabela 7. Número de estruturas recuperadas, número total de embriões, de embriões transferíveis e congeláveis (média ± d.p.), bem como taxas de recuperação, de fertilização, de embriões transferíveis e de congelabilidade (%) de ovelhas Dorper, divididas em duas categorias de peso (Leve – L e Pesado – P) e tratadas com 200 (L-200 e P-200) ou 128 mg (L-128 e P-128) de pFSH.....	48

Tabela 8. Resposta estral e ovariana de ovelhas Dorper, agrupadas segundo as variáveis peso corporal (Pesado e Leve) e dose de pFSH (128 e 200 mg).....	49
Tabela 9. Número (média ± d.p.) de estruturas recuperadas, número total de embriões, de embriões transferíveis e congeláveis, bem como taxas (%) de recuperação, de fertilização, de embriões transferíveis e de congelabilidade de ovelhas Dorper, agrupadas segundo as variáveis peso corporal (Pesado e Leve) e dose de pFSH (128 e 200 mg).....	50

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANUALPEC - Anuário da Pecuária Brasileira

CL - Corpo Lúteo

E<sub>2</sub> - Estradiol

ECC - Escore de Condição Corporal

eCG - Equine Chorionic Gonadotropin; Gonadotrofina Coriônica Equina

FD - Folículo Dominante

FPO - Folículo Pré-ovulatório

FSH - Follicle Stimulating Hormone; Hormônio Folículo Estimulante

pFSH - Porcine Follicle Stimulating Hormone; Hormônio Folículo Estimulante Suíno

oFSH - Ovine Follicle Stimulating Hormone; Hormônio Folículo Estimulante Ovino

GnRH - Gonadotrophin releasing hormone; Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IGF-I - Insulin Growth Factor I; Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I

LH - Luteinizing Hormone; Hormônio Luteinizante

MOTE - Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões

OMI - Oocyte maturation Inhibitory; Fator inibidor da maturação do oócito

P<sub>4</sub> - Progesterona

PGF<sub>2α</sub> - Prostaglandina F<sub>2α</sub>

IETS - International Embryo Transfer Society; Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

UI - Unidades Internacionais

CIDR - Controlled internal drug release; Dispositivo interno de liberação controlada

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1. A raça Dorper.....	17
2.2. Morfofisiologia da reprodução em ovelhas.....	20
2.3. Produção <i>in vivo</i> de embriões ovinos.....	24
2.2.1. Fatores que afetam a produção de embriões ovinos.....	28
3. Justificativa.....	39
4. Objetivos.....	40
4.1. Objetivo Geral.....	40
4.2. Objetivos Específicos.....	40
5. Material e Métodos.....	41
6. Resultados.....	47
7. Discussão.....	51
8. Conclusões.....	55
9. Referências Bibliográficas .....	56

## 1. Introdução

Em sistemas de produção de ovinos em escala, a produtividade dos rebanhos, a precocidade do animal ao abate, a qualidade do produto final e a eficiência reprodutiva são entraves no Brasil para uma maior rentabilidade e, conseqüentemente, para um crescimento ainda maior deste segmento do agronegócio (BICUDO et al., 2003). Dessa forma, as biotecnologias despontam como ferramentas a auxiliar esse ganho, destacando-se, para esse fim, a Sincronização do Estro, a Inseminação Artificial e a Múltipla ovulação e transferência de Embriões (MOTE).

A MOTE Consiste em aumentar a produção embrionária, através do aumento do número de oócitos liberados, após a administração de hormônios, em uma fêmea geneticamente superior, dentro de um período sexual, e transferir esses embriões para o trato reprodutivo de fêmeas de baixo valor genético, para completarem a gestação (OLIVEIRA & GONZALES, 1992).

Existem diversos fatores que podem influenciar o sucesso da MOTE, afetando quanti e qualitativamente a produção de embriões (COGNIE et al., 2003). Esses fatores podem ser divididos em fatores internos ou externos. Dentre os fatores internos que afetam diretamente a doadora de embriões, o *status* ovariano, a raça, o peso vivo e o escore de condição corporal são os mais importantes (RUBIANES et al., 1997; SPICER, 2001; GONZALEZ-BULNES et al., 2002; AMMOUN et al., 2006; BARTLEWSKI et al., 2008). Já dentre os fatores externos, a nutrição e o tratamento hormonal superovulatório é o de maior destaque (MAGALHÃES et al., 2009; O'CALLAGHAN et al., 2000). No entanto, a variação da resposta superovulatória tem sido muito grande, o que explica o interesse de diversos pesquisadores em encontrar novos hormônios, doses e momentos para realizar a estimulação ovariana, com a finalidade de formular protocolos com capacidade de estabilizar e racionalizar os programas de superovulação (ANDRIOLI et al., 1999; D'ALESSANDRO et al., 1996; BOSCOS et al., 1997; WEIWEI WU et al., 2011).

As duas preparações gonadotróficas mais largamente utilizadas para a superovulação são a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e o Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) (COGNIE et al., 2003). Entretanto, o FSH, seja de

origem suína (pFSH) ou ovina (oFSH), é o hormônio mais utilizado comercialmente em programas de MOTE no Brasil (D'ALESSANDRO et al., 2005; VEIGA-LOPEZ et al., 2005). Dentre as preparações comerciais de FSH disponíveis, existem diversos fatores que podem influenciar a taxa de ovulação e a produção de embriões de ovelhas, como o número e intervalo entre aplicações, a proporção de FSH/LH do produto comercial, tratamentos hormonais prévios e, principalmente, a dose total utilizada (BOSCOS et al., 1997; D'ALESSANDRO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009).

O fator dose é de grande relevância na obtenção de respostas superovulatórias homogêneas (D'ALESSANDRO et al., 1996; BOSCOS et al., 1997; WEIWEI WU et al., 2011). Diversos estudos vêm demonstrando que doses de FSH muito altas ou muito baixas durante o tratamento superovulatório podem causar uma diminuição na quantidade de embriões transferíveis (D'ALESSANDRO et al., 1996; BOSCOS et al., 1997).

Assim, supõe-se que, em doadoras mais leves, o aumento da dose de FSH teria efeito negativo e levaria à conseqüente superestimulação dos ovários. Quando vários folículos são estimulados, limitações físicas dentro do ovário, como suprimento sanguíneo para folículos individuais ou quebra dos mecanismos endócrinos normais e produção excessiva de esteróides ovarianos, poderiam interferir com o apropriado desenvolvimento folicular ou na ovulação (KATANYA et al., 2009). Com isso, um maior número de folículos seria estimulado a continuar o desenvolvimento com altas doses de FSH, mas poucos seriam capazes de ovular e sofrer luteinização ou tornar-se atrésicos (D'ALESSANDRO et al., 1996). Aliado a isso, estudos preliminares utilizando diferentes doses de FSH em ovelhas Dorper são escassos, fazendo-se necessário investigar se há grande variabilidade superovulatória atribuída à relação dose e peso do animal.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. A raça Dorper

No início da década de 30 com a queda dos preços da lã a exportação de carne de cordeiros aumentou rapidamente na África do Sul. Entretanto, nesta época, o rebanho local era composto de animais de raças nativas das savanas, que possuíam grande adaptabilidade as condições climáticas e vegetação da região, contudo, estes animais apresentavam problemas, como crescimento lento e características de carcaça indesejáveis para o mercado consumidor europeu. Portanto, surgiu a necessidade de selecionar uma nova raça ovina que não apresentasse estacionalidade reprodutiva e que fosse capaz de produzir cordeiros com crescimento rápido nas condições da Savana africana, com carcaças de boa qualidade (MILNE, 2000).

Em 1942 pesquisas intensas e tentativas de cruzamentos foram realizadas pelo Departamento de Agricultura, faculdades, centros de pesquisas e fazendas experimentais, com cooperação de criadores. Devido ao excelente desempenho do Black Head Persian, especialmente sob condições ambientais adversas, esta raça foi selecionada como a raça mãe. Como raça paterna foi selecionado o Dorset Horn, porque esta raça demonstrou não ser estacionária, nas Latitudes do sul da África, além de apresentar carcaça com características desejáveis pelos europeus (MILNE, 2000). Foi observado que quanto mais sangue de Dorset Horn o cruzamento possuía, maiores as qualidades de carcaça, em compensação, a característica mais importante, adaptabilidade, perdia-se. A partir destas observações foram selecionados os melhores animais cruzados Dorset Horn x Black Head Persian para a padronização e registro das características da raça Dorper (ABCDORPER, 2013).

No final dos anos 90, a raça Dorper foi introduzida no Nordeste do Brasil, pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. - Emepa, Soledade, PB, que estudou a adaptabilidade da raça às condições semi-áridas daquela região. O objetivo precípua foi utilizar este novo genótipo ovino, especializado na produção de carne, em cruzamentos planejados com ovelhas de outras raças, ou como raça pura, pela sua adaptabilidade, habilidade

materna, altas taxas de crescimento e musculabilidade, gerando carcaças de qualidade (ROSANOVA et al., 2005).

A principal propaganda dos divulgadores da raça Dorper é a sua adaptação às condições tropicais de criação, basicamente sob a alegação de que esta raça foi desenvolvida nas savanas africanas em condições de pastagens extensivas e clima rigoroso. Algumas pesquisas ratificam o conceito de elevada adaptação do Dorper. Uma dessas adaptações está relacionada ao pastejo extensivo, sendo uma marcante característica do Dorper o hábito alimentar menos seletivo. Alimentar-se de uma maior diversidade de espécies vegetais torna-se importante principalmente sob condições extensivas e de pastagens naturais, onde há grande número de espécies forrageiras disponíveis aos animais. Animais Dorper utilizaram 90% das espécies vegetais disponíveis na pastagem, enquanto que os Merinos utilizaram apenas 60% do total de espécies, além de consumir menor quantidade de forragem por unidade de peso metabólico ( $PV^{0,75}$ ) (BRAND, 2000).

Uma das grandes limitações das raças lanadas é que estas ciclam apenas em determinado período do ano, o outono. Esta característica, sem dúvida alguma, é um entrave para que produtores utilizem matrizes dessas raças, mesmo com elas apresentando maior precocidade, maior ritmo de crescimento e melhor qualidade de carcaça. Todavia, ovinos Dorper apresentam poliestria contínua (SOUSA e LEITE, 2000). Segundo Elias et al. (1985), fêmeas Dorper não sofrem alterações endócrinas e/ou reprodutivas devido ao fotoperiodismo, permitindo-as ciclar em qualquer época do ano. Estes autores relataram que fêmeas Dorper em Israel apresentaram três estações de parições durante 21 meses. Sousa e Leite (2000) relataram um número médio de 16,3 ciclos estrais por ovelha/ano. A não-estacionalidade dessa raça apresenta-se como um grande diferencial em relação às raças exóticas lanadas especializadas na produção de carne (ROSANOVA et al., 2005).

O bom desempenho reprodutivo dos rebanhos ovinos influenciam diretamente a eficiência econômica do sistema produtivo, funcionando como indicativo da viabilidade de determinadas explorações zootécnicas, o desempenho reprodutivo dos ovinos varia de acordo com o manejo e com as condições ambientais a que estes estão expostos. A raça Dorper é

caracterizada pela precocidade sexual, segundo Schoeman e Wet (1993) ovelhas Dorper exibiram seu primeiro estro em uma idade média de 8,14 meses e peso vivo de 50,8 kg. Sob um sistema de parto acelerado, Schoeman e Burger (1992) observaram que ovelhas Dorper pariram pela primeira vez com uma idade média de 19,6 meses.). Elias et al. (1985) relataram uma duração do ciclo estral de 16,6 dias para as ovelhas Dorper primíparas e de 17,6 dias para as ovelhas maduras, neste mesmo experimento foi observado uma duração média do estro de 36 h para ovelhas maduras e de 28 h para as ovelhas primíparas. No Brasil, Sousa e Leite (2000) observaram um ciclo estral de 17,3 dias com o estro durando em média 33,3 h.

A fertilidade, número de fêmeas paridas dividido pelo número de fêmeas expostas, é um índice reprodutivo de grande importância, pois representa a capacidade das fêmeas do rebanho levarem a gestação a termo. Cloete et al (2000) em uma revisão de literatura sobre o tema, observaram uma fertilidade média, dentre os diversos trabalhos observados, de 0,9 para ovelhas Dorper, com variação entre 0,75 a 0,97 e uma boa prolificidade variando entre 1,45 a 1,6. Segundo Greeff et al.(1990) ovelhas Dorper apresentam uma taxa de ovulação de 1,50 e perdas de embriões de 0,66 em média.

A principal característica de uma raça ovina, do ponto de vista econômico, é o peso ao desmame, sendo um bom indicativo da velocidade de crescimento dos cordeiros e da habilidade materna. Cloete et al.(2000) observaram em diversos experimentos conduzidos na África do Sul, com diferentes sistemas de manejo, um ganho de peso diário pré-desmame de 210 a 290 gramas e peso ao desmame de 18,2 a 41,3 kg de peso vivo, a idade ao desmame variou de 53 a 138 dias. Já no Brasil Sousa e Leite (2000), observaram que cordeiros Dorper alcançaram, nessa mesma fase, ganhos de até 203 g/dia, segundo estes autores, a Dorper pode alcançar peso vivo médio de 36 kg, num período de 100 a 120 dias de idade.

Nos últimos anos a raça dorper esta sendo utilizada como raça paterna, nas condições brasileiras da caatinga nordestina, com cordeiros  $\frac{1}{2}$  Santa Inês +  $\frac{1}{2}$  Dorper apresentando peso ao desmame (70 dias) de 17,7 kg e GMD de 176 g. Em confinamento, estes mesmo animais apresentaram GMD de 144, 184 e 234 g quando suplementados com concentrado a níveis de 1,5; 2,5; ou 3,5% do PV, respectivamente (BARROS et al., 2005). Quando se considerada

o cruzamento da raça Dorper com outras raças oriundas do Brasil, verificou-se crescimento bem mais acelerado para as cruzas Dorper x Santa Inês do que para as cruzas Dorper x Morada Nova ou Dorper x Rabo Largo. Ganho médio diário de 200, 156 e 143 g foram obtidos para cruzamentos  $\frac{1}{2}$  Dorper +  $\frac{1}{2}$  Santa Inês,  $\frac{1}{2}$  Dorper +  $\frac{1}{2}$  Morada Nova e  $\frac{1}{2}$  Dorper +  $\frac{1}{2}$  Rabo Largo, respectivamente (MALHADO et al., 2009).

## 2.2. Morfofisiologia da reprodução em ovelhas

A atividade reprodutiva é a expressão fisiológica de um conjunto complexo de mecanismos e fenômenos que obedecem a um rígido controle endógeno de um sistema hierarquizado de órgãos que se inter-relacionam, mediante mecanismos bioquímicos sincronizados (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2008).

Um ciclo estral é definido como o conjunto de alterações endócrinas, comportamentais e morfológicas ocorridas entre duas ovulações sucessivas, que se estabelece após a puberdade. Todas essas mudanças durante o ciclo estral estão reguladas por uma interação entre os hormônios sintetizados e secretados no hipotálamo, na hipófise, nas gônadas (ovários) e no útero, constituindo o que se conhece como eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal-uterino. Esse controle ocorre através de um sistema de regulação no qual um hormônio pode inibir a liberação de outro hormônio (retro-alimentação negativa) ou, ao contrário, estimular a síntese e liberação de uma maior quantidade de outro hormônio (retroalimentação positiva) (MORAES et al., 2002).

O ciclo estral da ovelha tem duração normal que pode variar de 14 a 19 dias, com média de 17 dias, podendo ser dividido em duas fases distintas:

1) Folicular: caracterizada pelo desenvolvimento do folículo (estrutura no ovário que contém o oócito) e culmina com a liberação do mesmo (ovulação). Nesta fase, encontram-se presentes o proestro e estro.

2) Luteínica: caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo (CL) que é formado após a ruptura do folículo e liberação do oócito. É produzida a progesterona, que é o hormônio responsável pela manutenção da gestação.

Nesta fase, encontra-se incluído o metaestro e diestro (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O hipotálamo, parte do diencéfalo, forma o assoalho e parte das paredes laterais do terceiro ventrículo. Limita-se anteriormente pelo quiasma óptico e lâmina terminalis, atrás pelos corpos mamilares. As células neurais peptidérgicas hipotalâmicas, altamente especializadas, possuem características tanto de neurônios como de células endócrinas e sintetizam e secretam peptídeos neuro-hormonais. Algumas dessas substâncias, como a vasopressina e a ocitocina, seguem os axônios das células em direção ao processo infundibular onde ficam armazenadas. Outras, como os fatores liberadores, são levadas, também via axônio, até a eminência media; a partir daí são carregadas para a hipófise anterior através do sistema porta-hipofisário. Em contato com as células adenohipofisárias esses fatores liberadores induzem a produção das respectivas trofinas (PLAISANT, 1973).

Na área pré-óptica e no núcleo arqueado do hipotálamo ocorre a secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). Essa área recebe inúmeras informações externas (visual, tátil e olfatória) através de neurônios que convergem para o hipotálamo. Daí, a informação é processada e modificada para ser enviada à hipófise como um sinal humoral e/ ou neural, estimulando a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O FSH e LH são hormônios glicoprotéicos sintetizados pela adeno-hipófise e que regulam a função ovariana. Durante a fase pré-púbere, estes hormônios são secretados em níveis basais e, somente após a puberdade, ocorre um aumento da secreção e o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios. O FSH e LH, por meio da corrente sanguínea, chegam até o ovário e estimulam o crescimento folicular até o estágio de folículos pré-ovulatórios. Com o crescimento folicular, as células da granulosa tornam-se diferenciadas e secretam quantidades crescentes de estrógeno (HAFEZ et al., 2004).

A foliculogênese é um processo complexo que envolve a formação e crescimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios. O desenvolvimento folicular na ovelha começa com o crescimento de alguns folículos presentes na reserva primordial de folículos. Estes são folículos

primordiais inativos formados durante a vida pré-natal (GORDON, 1997). Este processo pode ser dividido nas fases pré-antral e antral.

Em borregas, após o nascimento, é estimado que existam cerca de 100 a 200 mil folículos primordiais e, destes, apenas cerca de 50 vão chegar a folículos antrais, durante a vida adulta de uma ovelha. Na fase pré-antral, ocorre a ativação dos folículos primordiais e posterior crescimento para os estágios de folículos primários e secundários (EVANS, 2003).

A fase antral tem início com o aparecimento do antro nos folículos terciários, em consequência do aumento na quantidade de líquido folicular, terminando com a formação do folículo pré-ovulatório ou de *De Graaf*. Nessa fase, o crescimento folicular está diretamente ligado à produção de LH e FSH (MATZUK et al., 2002).

Os principais componentes do líquido folicular são: Estrógenos (quantidades crescentes com o desenvolvimento), Progesterona – P<sub>4</sub> (presente nos folículos em atresia e próximo à ovulação), Fator inibidor da maturação do oócito (OMI) e Inibina. O líquido folicular possui várias funções, tendo como principais: controlar o crescimento do folículo (E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>), regular a maturação do oócito (OMI), facilitar a capacitação do oócito e acelerar o metabolismo do espermatozóide (ANTONIOLLI, 2002).

O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica folicular e remete ao crescimento destas estruturas em ondas ou grupos (ESPINOZA-VILLAVIENCIO et al., 2007). Em cada onda, um grupo de folículos é recrutado e escolhido para sair da letargia e iniciar um processo de crescimento. A partir desse grupo, um ou mais folículos são selecionados, e continuam seu crescimento dando origem a um grande folículo, chamado dominante, e vários folículos subordinados; o dominante será anovulatório, se ocorrer durante a fase em que o corpo lúteo encontra-se ativo e secretando altos níveis de progesterona, mas será ovulatório se ocorrer no momento em que os níveis de progesterona estiverem baixos, devido à luteólise (GINTHER et al., 1996).

Após o recrutamento, ocorre a fase de seleção ou divergência. Nesse momento, um folículo continua a crescer tornando-se folículo dominante (FD) e os demais atingem um platô e, depois, reduzem suas taxas de crescimento,

tornando-se subordinados, momento esse chamado de divergência. Outra característica do FD é a sua alta capacidade de produzir estradiol e inibina. No dia cinco do ciclo estral, é muito maior a concentração de estradiol no FD em relação aos seus subordinados e acredita-se que isso reflita diretamente com o término do aumento na concentração de FSH e na manutenção de níveis basais desse hormônio (FORTUNE et al., 2001).

No início do estágio de crescimento ou recrutamento, são necessários receptores de FSH na célula da granulosa até que os folículos atinjam 3 mm de diâmetro. Durante o desenvolvimento folicular, uma importante etapa é a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa, pois o LH é progressivamente hábil para promover a maturação Oocitária. Em ovinos, os receptores de LH começam a ser expressos nas células da teca de grandes folículos secundários (SILVA et al., 2002).

Segundo Gordon (1997), os FD presentes no momento do primeiro pico de LH, após período de anestro, podem não estar suficientemente maduros a ponto de responder a liberação de LH e produzir um CL normal, levando a uma fase lútea, com produção de progesterona, de curta duração. O pico pré-ovulatório de LH leva à ovulação de um ou mais folículos e à luteinização da estrutura folicular remanescente, formando o CL.

O CL da ovelha atinge sua atividade máxima de produção de progesterona por volta do sexto dia do ciclo estral e esta secreção se mantém até a luteólise (GORDON, 1997). A progesterona secretada durante o período luteal exerce diversas funções durante o ciclo estral. Inibe a liberação de GnRH, o subsequente pico de LH e a secreção de Prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) durante os primeiros dias da fase lútea (RUBIANES, 2000).

A partir do dia 11 ou 12 do ciclo, inicia a produção da ocitocina luteal e  $PGF_{2\alpha}$  endometrial que termina com a lise do corpo lúteo, o que acarreta em uma queda da progesterona plasmática. Neste mecanismo estão envolvidos a própria progesterona e o estrógeno. A diminuição da progesterona permite um aumento nos pulsos de GnRH e LH, que estimulam a secreção de estradiol pelo ovário. O aumento do estradiol propicia o comportamento de estro e o pico pré-ovulatório de GnRH e LH. Em contraste, a concentração de FSH diminui suprimida, pelo estradiol e inibina secretados pelo folículo pré-

ovulatório. O pico de LH induz a ovulação e luteinização, diminuição da secreção de estradiol e inicia-se um novo ciclo (RUBIANES, 2000).

## 2.2. Produção *in vivo* de embriões

A MOTE é uma biotecnologia que consiste em estimular a superovulação, com o auxílio de gonadotrofinas, em ovelhas de alto valor genético, transferindo estes embriões para ovelhas de baixo valor genético, para que estas, por sua vez, finalizem a gestação e possam aleitar os cordeiros que venham a nascer (HARESIGN, 1992). Desta forma, podemos lançar mão desta técnica para multiplicar de forma rápida a prole de uma determinada fêmea, possibilitando uma aceleração no processo de melhoramento genético de um rebanho.

A produção de embriões passa, inicialmente, pela sincronização de estro, a qual tem por finalidade fazer com que um grupo de fêmeas entre em estro de forma agrupada, favorecendo a execução da cobertura natural ou inseminação artificial. De acordo com Baril et al. (1995), nas fêmeas doadoras, a sincronização possibilitou a obtenção de embriões no mesmo estágio de desenvolvimento; já para as receptoras, a finalidade seria fazer coincidir o seu estado fisiológico com o das doadoras, condição esta que favorece aos embriões uma melhor sobrevivência e desenvolvimento pós-transferência. Os métodos mais utilizados para a sincronização do estro e da ovulação em pequenos ruminantes envolvem implantes impregnados com progesterona e/ou progestágenos, com o objetivo de bloquear o eixo hipotalâmico-hipofisário, impedindo a entrada dos animais na fase folicular do ciclo estral, e ao retirar este bloqueio de forma sincronizada, todos os animais entraram na fase folicular ao mesmo tempo, culminando no estro (MARTÍNEZ et al., 2007; URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2008).

Os princípios da indução da superovulação em caprinos e ovinos são semelhantes àqueles conhecidos para bovinos. Aplica-se uma gonadotrofina folículo-estimulante durante a parte final da fase luteal do ciclo estral, ou seja, entre os dias 11 e 13 ou em torno de 1 a 2 dias antes do fim do tratamento de sincronização do estro (ISHWAR e MEMON, 1996).

A superovulação, por sua vez, pode ser definida como o processo pelo qual um número maior de folículos ao geneticamente estabelecido durante um ciclo estral natural, é recrutado e selecionado para chegar à ovulação. Entende-se que os hormônios utilizados nos protocolos de superovulação, por aplicação de gonadotrofinas exógenas, atuam em três mecanismos: (1) Alguns folículos que estão em estágio inicial de atresia poderiam ser "resgatados", presumidamente, pela estimulação hormonal que induziria uma reativação dos mecanismos normais, resultando na esteroidogênese normal e também num maior índice de mitose; (2) Grupos de pequenos folículos, às vezes de diferentes classificações morfológicas e funcionais, seriam estimulados em conjunto, num ritmo de desenvolvimento superior ao normal, atingindo simultaneamente um mesmo estágio de desenvolvimento num curto período; (3) O processo de atresia folicular poderia ser reduzido, ou seja, um número menor de folículos destinar-se-ia a este processo (FERNANDES, 2003).

As duas preparações gonadotróficas mais, largamente, utilizadas para a superovulação são a eCG e o FSH. A eCG é administrada como uma única injeção intramuscular (1000 a 2000 UI), 1 dia antes do fim do tratamento de sincronização do estro (COGNIE et al., 2003). Já o FSH é administrado em seis a oito doses decrescentes, a intervalos de 12 horas, durante três a quatro dias, iniciadas dois a três dias antes da remoção do progestágeno, sendo, atualmente, o principal hormônio utilizado em programas de superovulação (D'ALESSANDRO et al., 2005; VEIGA-LOPEZ et al., 2005).

A forma de fertilização das fêmeas doadoras de embriões também é importante, podendo ser feita através da monta natural, inseminação artificial ou utilizando as duas formas. A fertilização bem sucedida de fêmeas doadoras de embriões é também dependente da sincronia entre o momento da inseminação e as ovulações (D'ALESSANDRO et al., 2005).

Os métodos de colheita de embriões, em geral, têm sido pouco aperfeiçoados, quando comparados àqueles descritos por Hunter et al. (1955). A colheita de embriões pode ser realizada pelos métodos: cirúrgico (laparotomia), semicirúrgico (laparoscopia) e não cirúrgico (transcervical).

A técnica de colheita de embriões mais em uso, em ovinos, ainda, é a laparotomia (ISHWAR & MEMON, 1996; FOLCH et al., 2001; NAQVI et al., 2002; SELVARAJU et al., 2003). Por este método, os embriões podem ser

colhidos com sucesso tanto da tuba uterina quanto do útero. A exteriorização dos cornos uterinos, tubas uterinas e dos ovários deve ser feita com a fêmea em decúbito dorsal, em maca apropriada, com uma inclinação ântero-posterior de 30° a 45°. Com a exteriorização dos ovários, é realizada a contagem dos corpos lúteos, a qual permitirá a avaliação da eficácia do método cirúrgico de colheita de embriões através da obtenção da taxa de recuperação embrionária. A lavagem das fêmeas, seja uterina ou tubária, é realizada com PBS a 37 °C. Os lavados são colhidos em placas de Petri, plásticas, para avaliação imediata e contagem em estereomicroscópio, em um aumento de 80 vezes (Figura 1).

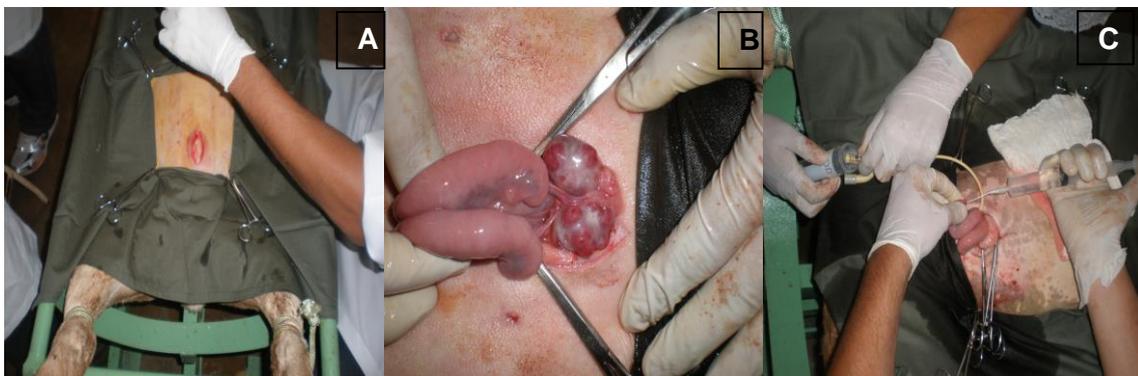


FIGURA 1. Coleta cirúrgica de Embriões. **A-** conteção do animal e local de incisão; **B-** exteriorização do trato reprodutivo e realização da contagem dos corpos lúteos; **C-** lavagem do útero.

Na avaliação individual dos embriões, são várias as características a serem observadas tais como: tamanho, forma, cor, homogeneidade do citoplasma, forma e integridade da zona pelúcida, tamanho e presença de vesículas (ROBERTSON e NELSON, 2010).

Considerando os parâmetros descritos, os embriões recebem uma identificação, que varia segundo os autores. A Tabela 1 mostra como a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) classifica os embriões.

Tabela 1. Qualidade embrionária e suas respectivas características (ROBERTSON & NELSON, 2010)

Qualidade embrionária	Características
Código I: (Excelente ou Bom)	Massa embrionária simétrica e esférica, com blastômeros (células) individuais uniformes em tamanho, cor e densidade. Irregularidades devem ser relativamente menores e, pelo menos, 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável intacta. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas.
Código II: (Regular)	Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Pelo menos 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável, intacta.
Código III: (Pobre)	Irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Pelo menos 25% do material celular deve formar uma massa embrionária viável, intacta.
Código IV: (Morto ou degenerado)	Embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.

Os embriões classificados como I, II e III são passíveis de transferência. No entanto, para a micromanipulação e a criopreservação, somente os embriões I e II são utilizáveis (ROBERTSON e NELSON, 2010).

### 2.3. Fatores que afetam a produção de embriões

A produção *in vivo* de embriões nos pequenos ruminantes tem apresentado um desenvolvimento considerável nos últimos anos. Entretanto, existem fatores que influenciam a resposta à MOTE, sejam eles ligados aos manejos geral, nutricional e sanitário; à idade do embrião; ao método de colheita utilizado; à avaliação dos embriões; ao grau de sincronia doadora-receptora; à idade e à raça da doadora utilizada; e à taxa de ovulação. Este último é considerado o principal fator que limita o emprego mais amplo desta tecnologia, havendo a necessidade de procedimentos que possibilitem um aumento no número médio de embriões viáveis por colheita. Baixas taxas de fertilidade, observadas em doadoras ovinas superovuladas, após monta natural ou inseminação vaginal e/ou transcervical, podem ser atribuídas a um distúrbio no transporte dos gametas ou à má qualidade dos oócitos. Ambos os problemas podem estar correlacionados à influência do tratamento superovulatório (COGNIE et al., 2003).

Portanto, a imprevisibilidade da resposta ovariana à superovulação, ou a impossibilidade de assegurar que uma doadora, em potencial, produza um número satisfatório de bons embriões, em determinado período de tempo, é aspecto limitante da contribuição que a transferência de embriões pode trazer ao melhoramento genético. Dois tipos de fatores têm sido sugeridos como determinantes na resposta ovariana: (1) fatores exógenos, relacionados principalmente com o tipo e forma de administração das gonadotrofinas; e (2) fatores endógenos, relacionados, principalmente, com o *status* ovariano do animal, isto é, o número de folículos susceptíveis de responder às gonadotrofinas no início de sua aplicação, além da raça, peso vivo e escore de condição corporal (ALVAREZ, 1994; RUBIANES et al., 1997; SPICER 2001; GONZALEZ-BULNES et al., 2002; AMMOUN et al., 2006; BARTLEWSKI et al., 2008).

#### 2.3.1. Fatores Endógenos

##### Tratamentos Consecutivos

No que se refere à diminuição de respostas a estimulações consecutivas, sabe-se que, em alguns casos, estas ocorrem devido às concentrações de anticorpos anti-FSH e às falhas de fecundação em fêmeas de alta resposta superovulatória (COGNIÉ, 1999). Al-Kamali et al. (1985), por exemplo, observaram na raça ovina Texel, queda significativa na manifestação de sintomas de estro e no número de ovelhas que ovularam, assim como diminuição na taxa de ovulação após o segundo tratamento superovulatório com extrato da adenohipófise eqüina, administrado a intervalo de 55 a 76 dias.

A exteriorização do trato reprodutivo por Laparotomia, com o objetivo de colher embriões, envolve algum grau de trauma cirúrgico e, frequentemente, leva à formação de aderências pós-operatórias, as quais podem envolver o útero e os ovários. A colheita cirúrgica de embriões, realizada de forma repetida na mesma doadora, afeta, negativamente, a taxa de recuperação embrionária, o que a torna de uso limitado, particularmente, em animais de alto valor genético. Andrioli et al. (1999) verificaram uma redução de 85% para 78,2% na taxa de recuperação, após três colheitas sucessivas nos mesmos animais da espécie caprina. Quan et al. (2011) encontraram uma redução de 10,5 para 6,9 embriões colhidos entre a primeira e terceira colheita. Forcada et al. (2000) observaram uma redução de 4,1 para 2,4 embriões ovinos congeláveis, após três tratamentos superovulatórios.

No entanto, é possível minimizar os efeitos negativos deste método de colheita de embriões pela aspersão do útero e dos ovários com soro fisiológico heparinizado (50 UI de heparina sódica/mL) ou com solução de Dextran 70 g a 6%. A sutura, por sua vez, pode ser realizada com um padrão simples interrompido com fio de poliglactina 2-0 (ISHWAR & MEMON, 1996).

### Status ovariano

A estimulação com o FSH pode ser influenciada por outros fatores, como a presença de um folículo dominante. Verificou-se que quando aplicadas múltiplas doses de FSH, em ovelhas que apresentavam um folículo  $\geq 4$  mm (3° dia de emergência da onda folicular), não houve superovulação em ovelhas tratadas com aquela gonadotrofina exógena, entretanto, quando o tratamento começou no momento da emergência da 1ª onda, ocorreu forte estímulo

superovulatório (RUBIANES et al., 1997). Com base nesses dados, foi idealizado um novo protocolo, chamado de “Protocolo do Dia 0”.

No dia 0 (Zero), dia da ovulação, todas as ovelhas tem um grupo homogêneo de pequenos folículos em crescimento, e nenhuma delas possui um folículo dominante. Quando o tratamento é iniciado e folículos ovarianos responsivos ao tratamento estão em um momento de maturação similar, estes desencadeiam um processo adequado de ovulações múltiplas. Por outro lado, se o grupo de folículos apresenta uma grande heterogeneidade, a resposta é caracterizada por um processo assincrônico no crescimento e luteinização folicular, o que pode acarretar a uma função luteal inadequada ou cistos foliculares luteinizados (RUBIANES et al., 1997).

O “Protocolo do Dia 0” esta sendo usado, comercialmente, em programas de superovulação e transferência de embriões de pequenos ruminantes. O tratamento com FSH é iniciado após a detecção ultrassonográfica da ovulação ou a partir do momento esperado para que ela ocorra (Dia 0), podendo ser 36 h após o início do estro ou 84 h após a aplicação do protocolo de curta duração. A dose total de FSH é dividida em seis ou oito aplicações iguais ou em forma de doses decrescentes. Além disso, juntamente com as duas últimas doses de FSH, são administradas duas doses de PGF<sub>2α</sub> que, somadas, correspondem à dose luteolítica, garantindo, assim, a luteólise (RUBIANES e MENCHACA, 2006)

Menchaca et al. (2009) utilizaram 44 ovelhas da raça Merino e compararam a produção e a qualidade de embriões após superovulação com o “Protocolo do Dia 0” e com o protocolo Tradicional. O “Protocolo do Dia 0” foi superior ao Tradicional no tocante aos números médios de CL, estruturas colhidas e de embriões transferíveis (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de corpos lúteos e embriões de ovelhas Merino, tratadas com o Protocolo do Dia 0, comparado ao protocolo Tradicional de superovulação (Adaptado de MENCHACA et al., 2009).

Parâmetros	Protocolo Tradicional (n = 22)	Protocolo do Dia 0 (n = 22)
Nº de CL (média ± d.p.)	10,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	13,5 ± 1,4 <sup>c</sup>
Nº de embriões transferíveis (média ± d.p.)	5,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	7,9 ± 1,4 <sup>b</sup>
Nº de estruturas colhidas (média ± d.p.)	8,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,3 ± 1,2 <sup>b</sup>
Taxa de Fertilização (%)	82,4 <sup>a</sup>	84,1 <sup>a</sup>

Valores com letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa (<sup>a, b</sup> P < 0,01; <sup>a, c</sup> P < 0,05).

### Idade

A idade da doadora também é um fator de grande importância, que influencia a produção de embriões. Animais mais jovens apresentam uma menor resposta ao tratamento hormonal e, conseqüentemente, produzem um menor número de embriões. Bari et al. (2000) observaram que marrãs apresentaram um menor intervalo entre a retirada do CIDR e o estro, menor número de ovulações e menor número de estruturas colhidas que ovelhas adultas (> que 3 anos), com valores médios de 26,3 h vs. 25,0 h; 11,9 CL vs. 9,5 CL; 8,4 vs. 6,5 estruturas colhidas, para ovelhas adultas e marrãs, respectivamente. Mais recentemente, Quan et al. (2011) também observaram menor número de embriões produzidos em ovelhas nulíparas quando comparadas com ovelhas pluríparas, sendo recuperados 5,7 e 8,2 embriões colhidos, respectivamente.

Esta redução é, provavelmente, devido ao menor número de folículos antrais responsivos ao FSH exógeno nos ovários das marrãs, principalmente devido à sua maior sensibilidade aos efeitos de feedback negativo de esteróides e da inibina (BAIRD et al., 1991). A partir destes resultados, é indicado evitar selecionar animais muito jovens, sobretudo, nulíparas, para programas de produção de embriões.

## Raça

Existem, no mundo, diversas raças ovinas e cada uma delas leva consigo sua característica produtiva, fenotípica e genética. Algumas delas passaram por rigorosos processos de seleção genética, seja realizado pelo homem seja pelo ambiente. Esta seleção pode ser benéfica em algumas características, mas, ao mesmo tempo, pode trazer malefícios ou até a perda de outras (PIMENTEL et al., 2011).

Vários estudos de MOTE comparam raças em uma mesma situação de manejo e de tratamento hormonal, sendo esta a forma mais confiável de fazer esse tipo de comparação. A Tabela 3 apresenta a influência de algumas raças sobre a resposta superovulatória e a produção *in vivo* de embriões.

Tabela 3. Produção média de corpos lúteos (CLs), do total de embriões e de embriões transferíveis em diversos experimentos.

Raça (n)	Nº de CLs	Nº total de embriões	Nº de embriões transferíveis	Fonte
Chios (34)	12,4	5,8	-	Bosco et al., 1997
Friesian (23)	7,0	3,9	-	Bosco et al., 1997
Scottish Blackface (87)	-	10,0	-	Bari et al., 2000
Welsh Mountain (63)	-	7,9	-	Bari et al., 2000
Blackface Mountain (20)	7,7	-	2,6	Crosby, 1993
Cheviot (20)	4,7	-	1,8	Crosby, 1993
Manchega (8)	9,8	6,7	-	Ammoun et al., 2006
Rubia del molar (9)	13,7	7,9	-	Ammoun et al., 2006
Negra de colmenar (7)	10,0	4,3	-	Ammoun et al., 2006

Boscos et al. (1997) observaram uma superioridade no número de CLs das ovelhas Chios em comparação à raça Friesian, quando estas foram tratadas com 16 mg de pFSH. Da mesma forma, Crosby (1993) verificou que houve uma superioridade da raça Blackface Mountain em relação à Cheviot. Ammoun et al. (2006), por sua vez, verificaram apenas superioridade da raça Rubia del molar em relação à Manchega.

Portanto, dentro da espécie ovina, há uma grande variação da resposta superovulatória e na produção *in vivo* de embriões, de acordo com a raça estudada. Diversos estudos suportam esta afirmação, pois nestes ocorre uma padronização de outros fatores que influenciam a superovulação como a idade, protocolo de superovulação, tipo e dose total da gonadotrofina utilizada (AMMOUN et al., 2006; BARI et al., 2000; BOSCO et al., 1997; CROSBY, 1993).

### 2.3.2.Fatores Exógenos

#### Nutrição

Em meio a estes fatores, possui relevante importância o fornecimento de nutrientes, os quais são indispensáveis ao desenvolvimento folicular, maturação dos oócitos, fertilidade e desenvolvimento embrionário, além da própria manutenção da gestação, pois atuam nas concentrações séricas de hormônios e outros metabólitos, influenciados por nutrientes ou oriundos dos mesmos (ROBINSON et al., 2006), principalmente na fase que antecede à implantação, os embriões sofrem muito a influência do ambiente onde estão se desenvolvendo, especificamente em relação aos nutrientes que são oferecidos à doadora. A dieta fornecida à matriz é de extrema importância para o embrião durante o período de pré-implantação e por todo o seu desenvolvimento (ASHWORTH, 1995).

As substâncias nutritivas presentes no útero de ovelhas prenhes são provenientes da alimentação. Desta forma, a mãe precisa estar bem nutrida, já que, de modo geral, os ruminantes apresentam uma implantação não invasiva.

Segundo McEvoy et al. (2001), alimentos contendo altos níveis proteicos para ovelhas influenciam, negativamente, o desenvolvimento embrionário, por resultar em crias excessivamente grandes. Em contraste, Edwards e McMillen (2002) afirmam que o déficit proteico, no período de pré-implantação de embriões, pode promover problemas no desenvolvimento. Somado a isso, ressalta-se a quantidade específica dos componentes da ração, bem como a quantidade de alimento fornecida às matrizes. Estes precisam ser respeitados e analisados para não afetar a produção de

embriões, pois, a depender da quantidade de alimento, haverá um maior ou menor fornecimento de componentes.

Outro componente importante da alimentação é a energia, pois é a partir dos constituintes energéticos que as células do organismo poderão manter suas funções vitais. Assim, a curto prazo, o fornecimento de energia está diretamente envolvido no crescimento do folículo pois animais com ingestão alimentar restrita tem alterado o crescimento folicular característico (RHODES et al., 1995). Entretanto, esse componente em excesso também pode causar danos à qualidade embrionária, pois alta concentração de glicose em ovelhas superovuladas resulta na redução de embriões de boa qualidade (YAAKUB et al., 1997)

O'Callaghan et al. (2000), ao alimentarem ovelhas durante o tratamento de superovulação com 50, 100 ou 200% das necessidades energéticas de manutenção, observaram que o grupo que recebeu 50% das necessidades de manutenção apresentou um número menor de folículos quando comparado aos grupos 100 ou 200%, com médias de 7,56, 12,0 e 12,36 folículos, respectivamente. Desta forma, seria economicamente interessante, sempre atendermos o mínimo as exigências nutricionais de manutenção, de qualquer nutriente, em um programa de produção de embriões.

### Tipo da gonadotrofina

As duas preparações gonadotróficas amplamente, utilizadas para a superovulação são a eCG e o FSH. A eCG tem como vantagens: aplicação simplificada, baixo custo e facilidade de obtenção. As suas principais desvantagens são: resultados heterogêneos, variabilidade entre partidas, possibilidade de reações anafiláticas, maior incidência de cistos foliculares, número significativo de embriões degenerados, formação de anticorpos anti-eCG e uma meia-vida longa (BARIL et al., 1995). Devido a esta última desvantagem, a ação prolongada da eCG pode resultar em uma alta incidência de folículos não ovulatórios junto com elevados níveis de estradiol produzidos por estes folículos (BLANCO et al., 2003).

Já o FSH é administrado em seis a oito doses decrescentes, intervaladas por 12 horas, durante três a quatro dias, iniciadas dois a três dias

antes da remoção do progestágeno, sendo, atualmente, o principal hormônio utilizado em programas de superovulação (D'ALESSANDRO et al., 2005; VEIGA-LOPEZ et al., 2005). Em revisão sobre o tema, Cognié (2003) cita que o FSH tem sido superior à eCG em termos de taxas de ovulação e fecundação e na produção de embriões de boa qualidade. As eficácias da eCG e do FSH foram comparadas quanto à resposta superovulatória em ovelhas, nas quais foi verificada uma taxa de ovulação média maior naquelas tratadas com FSH do que com eCG. Além disso, a incidência de grandes folículos que falharam em ovular foi sutilmente maior nas fêmeas tratadas com eCG do que com FSH, enquanto que, com relação ao número de embriões transferíveis, os animais tratados com FSH apresentaram valores bem superiores (BLANCO et al., 2003). Recentemente, foi observado que tratamento superovulatório, em ovelhas Chall, com 1500 UI de eCG, não foi eficaz, produzindo, em média,  $2,5 \pm 0,2$  ovulações, enquanto o tratamento utilizando pFSH + eCG resultou em  $7,1 \pm 0,1$  ovulações (SALEHI et al., 2010).

Ainda abordando a comparação entre eCG e FSH, observa-se a ocorrência de múltiplos cistos foliculares nas doadoras de embriões submetidas ao tratamento superovulatório com eCG, o que não se observa naquelas tratadas com FSH. Isto pode ser devido a uma metabolização consideravelmente mais rápida do FSH do que da eCG (BLANCO et al., 2003), implicando numa maior resposta estrogênica à eCG do que ao FSH.

Muitos protocolos de superovulação utilizam a eCG no final das aplicações de FSH com o intuito de estimular a ovulação dos diversos folículos de forma sincrônica. Entretanto, recentemente, um experimento com 264 doadoras de embriões foi realizado para verificar o efeito da eCG. Os animais foram alocados em três grupos experimentais para receber 300 (grupo 1, n = 83) ou 200 (grupo 2, n = 88) UI de eCG, ou sem eCG (grupo 3, n = 93), no momento da retirada do CIDR. Foi observado que a aplicação de eCG diminuiu a quantidade de estruturas colhidas, a qualidade dos embriões e a taxa de fertilização (MENCHACA et al., 2009) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da eCG (aplicada na remoção do CIDR) associada ao tratamento com FSH sobre a resposta ovariana e produção de embriões em ovinos (Adaptado de MENCHACA et al., 2009)

	300 UI de eCG (n = 83)	200 UI de eCG (n = 88)	Sem eCG (n = 93)
Nº de estruturas colhidas/ doadora	4,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,5 <sup>b</sup>
Nº de embriões transferíveis/ doadora	3,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
Nº de embriões fertilizados/ Nº de estruturas colhidas (%)	285/349 <sup>a</sup> (81,7%)	335/414 <sup>a</sup> (80,9%)	523/574 <sup>b</sup> (91,1%)

<sup>a, b</sup> Valores com letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa (P < 0,05).

### Dose da gonadotrofina

Por fim, o fator dose é de grande relevância na obtenção de respostas superovulatórias homogêneas. Sabe-se que doses de FSH muito altas ou muito baixas durante o tratamento superovulatório podem causar uma diminuição na quantidade de embriões transferíveis (D'ALESSANDRO et al., 1996; BOSCOS et al., 1997). Quando há uma redução muito grande na dose de FSH, ocorre uma diminuição no recrutamento folicular, o que diminui a taxa de ovulação e, conseqüentemente, o número de embriões transferíveis (BOSCOS et al., 1997). Já quando é aplicada uma dose muito grande daquela gonadotrofina, ocorre uma redução na fertilização e na qualidade dos embriões (D'ALESSANDRO et al., 1996).

Boscós et al. (1997), estudando dois níveis de FSH em tratamentos superovulatórios, em ovelhas das raças Chios e Friesian, observaram que, nas duas raças, houve uma redução no número de CL e de estruturas colhidas, quando a dose total de pFSH foi reduzida de 16 para 12 mg. Contudo, apenas na raça Chio, foi verificada uma redução no número de embriões colhidos de 4,1 ± 0,8 para 1,9 ± 0,6 (média ± desvio padrão).

D'Alessandro et al. (1996) observaram que um aumento na dose de p-FSH (Pluset<sup>®</sup>) altera a resposta ovariana, aumentando o número de ovulações. Entretanto, ao mesmo tempo, ocorre uma redução na taxa de fertilização e na qualidade dos embriões, diminuindo, desta forma, o número médio de embriões

transferíveis. O mesmo autor justifica que, ao elevarmos, demasiadamente, a dose da gonadotrofina, ocorre uma alteração endócrina, que, por sua vez, atrapalha as funções bioquímicas do oócito e o transporte dos espermatozoides.

Em experimento mais recente, foi verificado que a redução da dose total de pFSH de 150 para 120 mg, com redução no número de aplicações, não alterou a resposta superovulatória e a produção de embriões de ovelhas da raça Xinji. Portanto, seria possível a redução de custos de produção de embriões e no uso da mão de obra sem afetar o número médio de embriões (WU et al., 2011).

Fica claro que o nível de gonadotrofina utilizada em um programa de produção *in vivo* de embriões deve respeitar a fisiologia de cada raça ovina e que o aumento da dose, a partir de um determinado limite, é anti-econômico e anti-producente. Na Tabela 5, podemos observar o resumo dos resultados de alguns trabalhos que avaliaram diferentes doses de pFSH em ovelhas.

Tabela 5. Resultados médios de experimentos que testaram diferentes níveis de pFSH na superovulação de ovelhas.

Nº de CL	Nº total de embriões	Nº de embriões transf.	Hormônio	Dose Total	Nº de doses parciais	Fonte
5,5	2,6	-	pFSH	12 mg	6	Boscós et al., 1997 <sup>***</sup>
12,4	5,8	-	pFSH	16 mg	6	Boscós et al., 1997 <sup>***</sup>
3,6	2,3	-	pFSH	12 mg	6	Boscós et al., 1997 <sup>**</sup>
7,0	3,9	-	pFSH	16 mg	6	Boscós et al., 1997 <sup>**</sup>
8,0	-	4,1	pFSH	250 UI	4	D'Alessandro et al., 1996
10,8	-	2,8	pFSH	500 UI	4	D'Alessandro et al., 1996
13,7	-	1,3	pFSH	750 UI	4	D'Alessandro et al., 1996
12,6	-	2,0	pFSH	1000 UI	4	D'Alessandro et al., 1996
-	9,5	7,8	pFSH + eCG	150/500 mg	6	Wu et al., 2011
-	10,6	8,4	pFSH + eCG	120/500 mg	3	Wu et al., 2011
-	6,2	5,1	pFSH + eCG	90/500 mg	3	Wu et al., 2011
-	5,8	4,7	pFSH + eCG	150/500 mg	1	Wu et al., 2011*

<sup>\*\*\*</sup> Ovelhas da raça Chio; <sup>\*\*</sup> Ovelhas da raça Friesian; \*Foi adicionado polivinilpirrolidona (PVP) ao pFSH.

### 3. Justificativa

A utilização da MOTE por produtores de rebanhos ovinos de genética superior, permitiria uma maior oferta de reprodutores melhoradores aos pequenos criadores de ovinos do Nordeste brasileiro, entretanto, esta biotecnologia ainda apresenta alto custo e grande variabilidade de resposta. Uma possível redução da dose total de p-FSH em doadoras mais leves, levaria a uma diminuição dos custos da MOTE, além de impedir a quebra dos mecanismos endócrinos normais e produção excessiva de esteroides ovarianos, promovendo o apropriado desenvolvimento folicular e ovulação. Aliado a isso, estudos preliminares utilizando diferentes doses de FSH em ovelhas Dorper são escassos, fazendo-se necessário investigar a influência da relação dose e peso do animal na produção *in vivo* de embriões.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da dose de pFSH sobre a resposta ovariana e qualidade embrionária em ovelhas Dorper de duas categorias de peso.

### **4.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o percentual de manifestação de estro em ovelhas Dorper, submetidas à superovulação com pFSH (128 ou 200 mg), bem como as possíveis variações neste parâmetro reprodutivo com o peso corpóreo.

Observar o número de ovulações em ovelhas Dorper, submetidas à superovulação com pFSH (128 ou 200 mg), bem como as possíveis variações neste parâmetro reprodutivo com o peso corpóreo.

Verificar a taxa de recuperação embrionária em ovelhas Dorper, submetidas à superovulação com pFSH (128 ou 200 mg), bem como as possíveis variações neste parâmetro reprodutivo com o peso corpóreo.

Verificar a taxa de fertilização em ovelhas Dorper, submetidas à superovulação com pFSH (128 ou 200 mg), bem como as possíveis variações neste parâmetro reprodutivo com o peso corpóreo.

Avaliar a qualidade de embriões em ovelhas Dorper, submetidas à superovulação com pFSH (128 ou 200 mg), bem como as possíveis variações neste parâmetro reprodutivo com o peso corpóreo.

## 5. Material e Métodos

### 5.1. Ética animal

O experimento foi realizado após a aprovação institucional da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo todo protocolo experimental conduzido conforme os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o Protocolo nº 27051112.

### 5.2. Época e local

Este estudo foi realizado em junho e julho de 2012, durante o fim da estação de cobertura. O experimento foi realizado na Estação Experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, em Jaguarari, Bahia, localizada a 9° 51' 50" S de latitude e 39° 56' 50" O e a uma altitude de 662 m. A região apresenta precipitação anual de 400 mm, com chuvas ocorrendo principalmente entre os meses de Novembro a Abril. A temperatura média anual é de 23 °C (com máxima e mínima de 30°C e 18°C, respectivamente) e a humidade é de 67,06% (com máxima e mínima de 93,22% e 40,91%, respectivamente).

### 5.3. Animais experimentais

Foram utilizadas, como doadoras de embriões, 40 fêmeas ovinas da raça Dorper, nunca tratadas anteriormente com hormônios, selecionadas após ultrassonografia, evitando assim, que algum animal prenhe, bem como portador de alguma patologia genital, participasse do trabalho. As doadoras tinham  $47,9 \pm 8,5$  meses de idade (média  $\pm$  desvio padrão) e escore de condição corporal de  $2,8 \pm 0,2$  (média  $\pm$  desvio padrão) dentro de uma escala variando de 0 (extremamente magro) a 5 (obeso). Como reprodutores, foram utilizados dois carneiros Dorper de fertilidade comprovada por exame andrológico prévio.

Todos os animais foram submetidos a um regime semi-intensivo de produção, no qual passavam parte do dia em pasto de Caatinga preservada e, no final da tarde, recebiam, em instalações cobertas, feno de capim Tifton (*Cynodon spp.*), à vontade, além de ração concentrada, contendo farelo de milho e caroço de algodão, em quantidades de acordo com o peso médio de

cada categoria, atendendo a necessidade de animais em estação reprodutiva (NRC, 2007). Os animais tiveram água fresca e sal mineral a vontade. A sanidade destes animais foi mantida através de vacinação anual (contra Raiva), vermifugação, quatro vezes ao ano, casqueamento periódico para evitar Pododermatite.

#### 5.4. Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o Fatorial 2x2, dois pesos e duas doses de pFSH. As doadoras de embriões foram distribuídas em dois grupos, de acordo com a categoria peso, sendo Grupo Leve, formado por animais de até 49 kg (n = 20 animais) com média  $\pm$  d.p. de 44,4 kg  $\pm$  2,6 e Grupo Pesado, por animais acima de 49 kg (n = 20 animais) com média  $\pm$  d.p. de 51,5  $\pm$  2,1 kg. Cada grupo (Leve e Pesado) foi dividido ao acaso em dois subgrupos de 10 animais, distribuídos de acordo com o tratamento superovulatório proposto: animais superovulados com 200 mg de pFSH (L-200, composto por 10 animais do Grupo Leve; e P-200, composto por 10 animais do Grupo Pesado;) e com 128 mg da mesma droga (L-128, composto por 10 animais do Grupo Leve; e P-128, composto por 10 animais do Grupo Pesado) (Figura 2).

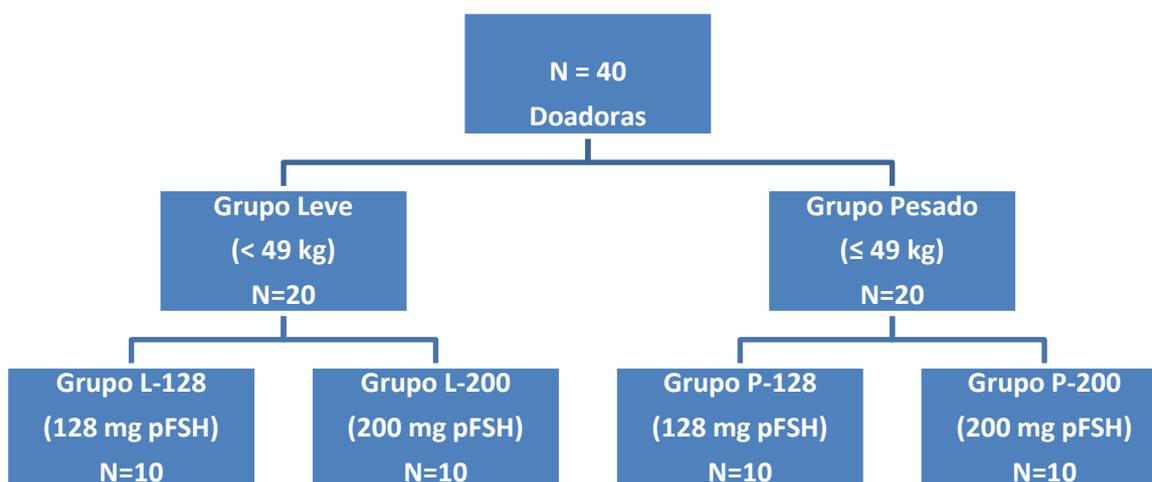


Figura 2. Delineamento experimental, exibindo os animais de até 49 kg de peso vivo (Grupo Leve – L; n = 20) ou acima de 49 kg de peso vivo (Grupo Pesado – P; n = 20), bem como os animais superovulados com 128 mg de pFSH (Grupos P-128 e L-128; n = 10, cada) e ovelhas superovuladas com 200 mg de pFSH (Grupos P-200 e L-200; n = 10, cada).

### 5.5. Tratamentos hormonais

As ovelhas foram submetidas a um tratamento de sincronização do estro de 12 dias de impregnação progesterônica, em que, no Dia Zero, foram inseridos dispositivos intravaginais impregnados com 330 mg de progesterona (CIDR-G<sup>®</sup>, Pharmacia, Brasil).

A partir do dia 10 do tratamento progesterônico, foi aplicado 0,13 mg de cloprostenol i.m. (Ciosin<sup>®</sup>), neste dia se iniciaram os diferentes tratamentos superovulatórios. Nos grupos P-200 e L-200, foi iniciada uma série de seis doses decrescentes de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V<sup>®</sup>, Vetrepharm, Canada), nos dias 10, 11 e 12, administradas, intramuscularmente, a cada 12 horas, (50/50, 25/25 e 25/25 mg), totalizando 200 mg. Enquanto nos grupos P-128 e L-128, foi feito o mesmo tratamento superovulatório, com exceção da dose, a qual foi de 128 mg, sendo fracionada, conseqüentemente, de forma diferente (32/32, 16/16 e 16/16 mg).

### 5.6. Detecção de estro e fertilização

O início do estro das ovelhas foi detectado utilizando, para isso, dois carneiros Dorper, de fertilidade comprovada, a partir de 12 horas após a remoção dos dispositivos intravaginais e, então, a cada quatro horas, por 72 horas após a retirada do dispositivo. As ovelhas foram cobertas no início do estro e 24 horas depois.

### 5.7. Avaliação da resposta superovulatória

Antes de serem submetidas à colheita de embriões, as doadoras foram submetidas a um jejum hídrico e alimentar de 12 e 24 horas, respectivamente, no quinto dia após a primeira monta. E, seis dias após a primeira monta e imediatamente antes da colheita de embriões, as ovelhas foram submetidas a uma Laparoscopia para visualizar a resposta ovulatória, conforme descrito por Oldham e Lindsay (1980), respeitando a ordem de aparecimento de estro. Para tanto, no local das punções destinadas à laparoscopia, as fêmeas receberam anestesia (SC) a base de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet<sup>®</sup> BRAVET, Brasil). Realizada a observação dos ovários, as ovelhas foram consideradas responsivas ao tratamento superovulatório, quando

apresentaram, contabilizando o somatório de ambos os ovários, cinco ou mais corpos lúteos (BARIL et al., 1995).

#### 5.8. Colheita de embriões

Obtida a resposta ovulatória, foi iniciado o procedimento de colheita de embriões, o qual foi realizado pelo método de laparotomia, com o uso do catéter de Foley. Momentos antes da colheita, as doadoras de embriões foram tricotomizadas na região abdominal e anterior ao úbere, onde foi borrifada uma solução iodada (2%) e álcool a 70%. Em seguida, foi aplicado um protocolo anestésico constituído de Sulfato de Atropina a 1% (Sultropin<sup>®</sup>, Sorologic Laboratory, Portugal), como pré-anestésico, na dose de 0,044 mg/kg, aplicado por via intramuscular, seguida pela aplicação de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser<sup>®</sup>, Laboratórios Calier S/A, Espanha), na dose de 0,22 a 0,30 mg/kg e, após 10 minutos, foi realizada a aplicação de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet<sup>®</sup>, BRAVET, Brasil), por via epidural alta, na dose de 4,4 a 10 mg/kg (Baril et al. 1995). Em seguida, foi aplicado 6-8 mL de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet<sup>®</sup> BRAVET, Brasil) na linha de incisão, que foi feita na linha Alba e mediu de 7 a 15 cm.

O trato reprodutivo foi, então, exteriorizado e, utilizando uma sonda de Foley n° 10 (Solidor<sup>®</sup>, LAMEDID, Brasil), foi feita uma via de recuperação de líquido, próximo à junção intercornual, na base de cada corno uterino, bem como outra, agora de injeção de líquido, com um cateter gelco 18G (Catéter intravenoso<sup>®</sup>, MEDCARE PVT, Índia), na junção útero-tubárica, também de cada corno uterino. Com isso, foi realizada a injeção de 40 mL de PBS (DMPBS<sup>®</sup>, VITROCELL, Brasil), em cada corno uterino, e o líquido foi recuperado pela sonda de Foley, em um tubo graduado de 50 mL (Tubo de centrifugação<sup>®</sup>, TPP, Suíça), possivelmente, contendo os embriões. Ao término da lavagem, foi aspergido soro fisiológico heparinizado (50 UI de heparina sódica/mL) sobre o trato reprodutivo, com o intuito de evitar a formação de aderências pós-operatórias. A sutura das diversas camadas foi efetuada, seguindo um protocolo padrão simples em três planos.

#### 5.9. Avaliação dos embriões recuperados

O lavado recuperado foi vertido em placas plásticas de Petri (placa de Petri 100<sup>®</sup>, Nutricell, Brasil) e submetido à procura e identificação das estruturas em estereomicroscópio (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japão), utilizando um aumento de 40 a 70x, bem como à avaliação dos embriões, quanto ao seu estágio de desenvolvimento e qualidade, seguindo os critérios morfológicos da IETS (ROBERTSON e NELSON, 2010): embriões de graus I (excelente ou bom), II (regular), III (pobre) e IV (morto ou degenerado). Foi ainda verificada homogeneidade da massa, presença de retração de massa embrionária e presença de ruptura de zona.

#### 5.10. Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados foram: proporção de fêmeas em estro; ocorrência e momento do estro, definido como o intervalo de tempo entre a retirada do CIDR e o início do estro; proporção de fêmeas superovulando, definida como o percentual de ovelhas possuindo cinco ou mais CL, somando-os em ambos os ovários; número médio de ovulações, definido como o número total de CL somados nos dois ovários; número de CL de baixa qualidade, definido como a soma dos CL com aspecto pálido em ambos os ovários; número de grandes folículos, definido como a soma dos folículos com mais de 5 mm de diâmetro em ambos ovários; números de oócitos (OOC), de zonas pelúcidas vazias (ZP) e de embriões recuperados (EMB); taxa de recuperação =  $[(\text{OOC} + \text{ZP} + \text{EMB})/\text{N}^\circ \text{ de CL}] \times 100$ ; números de embriões transferíveis (EMBT: Graus I, II e III) e congeláveis (EMBC: Graus I e II); taxas de fertilização (TF) e congelabilidade (TC) foram calculadas usando as seguintes equações:  $\text{TF} = [\text{EMB}/(\text{EMB} + \text{OOC})] \times 100$  e  $\text{TC} = [\text{EMBC}/\text{EMB}] \times 100$ .

#### 5.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (d.p.) ou em porcentagem. Para comparação dos diversos parâmetros, entre os grupos estudados, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida da realização do teste de Tukey. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste do Qui-quadrado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentaram nível de significância

menor que 5%. Todos os dados foram analisados utilizando o software estatístico ASSISTAT (2011).

## 6. Resultados

A Tabela 6 apresenta a resposta estral e ovariana dos grupos, podemos observar que todos os animais manifestaram estro e que, no tocante ao intervalo entre a retirada do CIDR e início do estro, este foi, em geral curto, com as ovelhas apresentando estro, em média ( $\pm$  d.p.),  $16,6 \pm 2,95$  h após o final do tratamento progesterônico, não havendo diferença entre os grupos.

Quanto à resposta superovulatória, houve uma variação entre 80 e 100% de resposta ao tratamento ( $P>0,05$ ). O grupo L-128 foi inferior em relação ao número médios de CLs, quando comparado ao P-200 ( $P<0,05$ ). Não houve diferença entre os quatro grupos quanto ao número médio de corpos lúteos de baixa qualidade e de folículos grandes persistentes ( $P>0,05$ ).

Tabela 6. Resposta estral e ovariana de ovelhas Dorper, divididas em duas categorias de peso (Leve – L e Pesado – P) e tratadas com 200 (L-200 e P-200) ou 128 mg (L-128 e P-128) de pFSH.

	Interação Peso x Dose			
	L-128	L-200	P-128	P-200
Nº. de ovelhas	10	10	10	10
Nº. de ovelhas em estro (%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Início do estro (h)	$17,6 \pm 3,4$	$16,0 \pm 2,7$	$17,6 \pm 2,8$	$15,2 \pm 2,5$
Nº. de ovelhas superovulando (%)	8(80%)	9(90%)	10(100%)	10(100%)
Número de CL	$9,3 \pm 4,4^b$	$15,1 \pm 5,9^{ab}$	$13,4 \pm 5,9^{ab}$	$17,6 \pm 5,8^a$
Nº. de CL em regressão	$0,3 \pm 1,0$	$0,7 \pm 2,2$	$1,9 \pm 4,0$	$0,1 \pm 0,3$
Nº. de grandes folículos	$0,1 \pm 0,3$	$0,7 \pm 1,1$	$0,9 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,7$

Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P<0,05$ ).

Quanto à produção de embriões, não foi verificada interação peso vivo x dose de pFSH ou qualquer diferença significativa entre os grupos experimentais, para os diversos parâmetros avaliados ( $P>0,05$ ) (Tabela 7).

Tabela 7. Número de estruturas recuperadas, número total de embriões, de embriões transferíveis e congeláveis (média  $\pm$  d.p.), bem como taxas de recuperação, de fertilização, de embriões transferíveis e de congelabilidade (%) de ovelhas Dorper, divididas em duas categorias de peso (Leve – L e Pesado – P) e tratadas com 200 (L-200 e P-200) ou 128 mg (L-128 e P-128) de pFSH.

	Interação Peso x Dose			
	L-128	L-200	P-128	P-200
Nº. de ovelhas superovulando	8	9	10	10
Nº. de estruturas	6,7 $\pm$ 2,1	10,8 $\pm$ 5,2	7,5 $\pm$ 4,5	8,9 $\pm$ 4,0
Nº. de embriões	5,5 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 1,8	6,3 $\pm$ 1,4	6,4 $\pm$ 1,3
Nº. de embriões transferíveis	4,3 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 1,2
Nº. de embriões congeláveis	4,0 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 1,1	4,4 $\pm$ 1,0
Taxa de fertilização*	83,0 (44/53)	53,6 (52/97)	84,0 (63/75)	71,9 (64/89)
Taxa de embriões transferíveis **	77,3 (34/44)	63,4 (33/52)	92,1 (58/63)	78,1 (50/64)
Taxa de congelabilidade***	72,7 (32/44)	61,5 (32/52)	87,3 (55/63)	68,7 (44/64)

\* Número de embriões / número de estruturas colhidas; \*\* Número de embriões de graus I, II e III / número de embriões colhidos; \*\*\* Número de embriões de graus I e II / número de embriões colhidos. ( $P>0,05$ )

Como foi verificada interação peso vivo x dose de pFSH, apenas em relação ao número de corpos lúteos, os demais parâmetros serão avaliados em função do peso vivo e da dose de pFSH separadamente, possibilitando desta forma determinar, o efeito da dose de pFSH sobre a resposta das ovelhas

tratadas, como também a influência do peso vivo da doadora de embriões sobre a produção *in vivo* de embriões de forma independente.

Quando comparamos os grupos de acordo com o peso, independentemente da dose, não houve diferença entre os animais pesados e leves, quanto às respostas estral e superovulatória ( $P>0,05$ ). Entretanto, ao compararmos os grupos, exclusivamente, de acordo com a dose de pFSH, podemos observar diferença entre os animais tratados com 200 e 128 mg em alguns dos parâmetros avaliados. Os animais tratados com 200 mg de pFSH apresentaram estro mais precoce quando comparados àqueles que receberam 128 mg ( $P<0,05$ ).

Tabela 8. Resposta estral e ovariana de ovelhas Dorper, agrupadas segundo as variáveis peso corporal (Pesado e Leve) e dose de pFSH (128 e 200 mg).

	Peso		Dose	
	Leve	Pesado	128 mg	200 mg
Nº. de ovelhas	20	20	20	20
Nº. de ovelhas em estro (%)	17(85%)	20(100%)	18(90%)	20(100%)
Início do estro (h)	16,8 ± 3,1	16,4 ± 2,8	17,4 ± 3,0 <sup>a</sup>	15,6 ± 2,6 <sup>b</sup>
Nº. de ovelhas superovulando (%)	17(85%)	20(100%)	18(90%)	19(95%)
Nº. de CL em regressão	0,5 ± 1,7	1,0 ± 2,9	1,1 ± 3,0	0,4 ± 1,6
Nº. de grandes folículos	0,4 ± 0,8	0,7 ± 0,8	0,5 ± 0,8	0,6 ± 0,9

Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P<0,05$ ).

Pode-se observar na Tabela 9, quando avaliamos quanto à dose de pFSH, que houve uma redução no número de estruturas colhidas quando a

dose de pFSH foi reduzida de 200 para 128 mg ( $P < 0,05$ ). Não foi verificada qualquer diferença entre os grupos quanto a produção de embriões ( $P > 0,05$ ), quando comparamos os grupos de acordo somente com o peso, bem como, quando o fizemos de acordo com a dose de pFSH.

Tabela 9. Número (média  $\pm$  d.p.) de estruturas recuperadas, número total de embriões, de embriões transferíveis e congeláveis, bem como taxas (%) de recuperação, de fertilização, de embriões transferíveis e de congelabilidade de ovelhas Dorper, agrupadas segundo as variáveis peso corporal (Pesado e Leve) e dose de pFSH (128 e 200 mg).

	Peso		Dose	
	Leve	Pesado	128 mg	200 mg
Nº. de ovelhas superovulando	17	20	18	19
Nº. de estruturas	8,7 $\pm$ 4,4	8,2 $\pm$ 4,20	7,1 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	9,8 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>
Nº de embriões	5,6 $\pm$ 3,3	6,4 $\pm$ 3,7	5,9 $\pm$ 3,5	6,1 $\pm$ 3,4
Nº de embriões transferíveis	3,9 $\pm$ 2,3	5,4 $\pm$ 3,6	5,1 $\pm$ 3,2	4,4 $\pm$ 3,1
Nº. de embriões congeláveis	3,8 $\pm$ 3,2	5,0 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 3,0	4,0 $\pm$ 2,7
Taxa de fertilização *	64,0 (96/150)	77,4 (127/164)	83,6 (107/128)	62,4 (116/186)
Taxa de embriões transferíveis**	69,8 (67/96)	85,0 (108/127)	86,0 (92/107)	71,6 (83/116)
Taxa de congelabilidade***	95,5 (64/67)	91,7 (99/108)	94,6 (87/92)	91,6 (76/83)

\*Número de embriões / número de estruturas colhidas; \*\*Número de embriões de graus I, II e III / número de embriões colhidos; \*\*\*Número de embriões de graus I e II / número de embriões

colhidos. Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

## 7. Discussão

O número médio de CL, foi o único parâmetro registrado que apresentou interação peso vivo x dose de pFSH, verificamos que a média de ovulações dos animais do grupo P-200 foi superior à média das ovelhas do grupo L-128 (Tabela 6), portanto doadoras de embriões Dorper com menos de 49kg ao receberem tratamento superovulatórios com 128 mg de pFSH apresentam número menor de ovulações. Entretanto, não observamos nenhuma diferença entre os grupos para os demais parâmetros, desta forma essa diferença de ovulações não influenciou no resultado final da produção de embriões *in vivo* em ovelhas Dorper.

Resposta semelhante foi encontrada por Boscos et al. (1997), quando diminuíram a dose de pFSH de 160 para 120 mg, em 6 aplicações. Entretanto, em trabalho mais recente, não foi observada uma redução no número de CL quando a dose de pFSH foi reduzida de 150 mg (6 aplicações) para 120 mg, (3 aplicações) (WU et al., 2011). Este fato pode ser justificado pela alta dependência dos pequenos folículos antrais, no momento do recrutamento, ao FSH (GONZALEZ-BULNES et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2009). Portanto, quando as primeiras doses de FSH são altas, mesmo quando a dosagem total do tratamento é reduzida, ocorre o recrutamento e crescimento de vários folículos e, como consequência, a taxa de ovulação é mantida (WU et al., 2011). Desta forma, a redução da taxa de ovulação do presente trabalho se deu principalmente pela redução do pFSH nas primeiras aplicações aliado a possível metabolização mais acelerada do pFSH nos animais mais leves.

Os principais resultados deste experimento foram encontrados quando avaliamos o peso vivo e a dose de pFSH separadamente. Todas as ovelhas, apresentaram estro em um intervalo bastante curto, todavia, houve uma antecipação do início do estro para os animais tratados com 200 mg quando comparados aos que receberam 128 mg de pFSH (Tabela 8). Este fato era esperado, pois quando aplicamos nas doadoras uma maior dose de pFSH, estimulamos a secreção folicular de  $17\beta$ -estradiol, o qual é o hormônio

responsável por desencadear os sinais do estro (BARTLEWSKI et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009). O estro observado nas doadoras de embriões ovinos Dorper, no presente estudo, iniciou de forma mais precoce quando comparado ao verificado por Forcada et al. (2011), em ovelhas Ojalada Soriana, e por Folch et al. (2001), trabalhando com a raça ovina Aragonesa. Isto pode ser explicado pelo fato que, nestes outros experimentos, foram utilizadas esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos, que, por sua vez, possuem uma metabolização mais lenta que a progesterona contida no CIDR utilizado em nosso trabalho, ocorrendo, desta forma, um desbloqueio do eixo hipotalâmico-hipofisário de forma mais tardia para os progestágenos (FLYNN et al., 2000; URIBE-VELASQUEZ et al., 2008).

Este parâmetro é de extrema importância em um programa de MOTE, principalmente quando associado à Inseminação Artificial (IA), pois o pico de LH e a, conseqüente, ovulação, estão associados ao início do estro (CAMPBELL et al., 1999) e, desta forma, pode ser considerado como indicativo para a realização da IA. Segundo Baril et al. (1993), a manifestação do estro mais precoce tornam os oócitos mais propícios à fertilização, pois quanto mais tardio o estro, menor a qualidade oocitária.

Em nosso trabalho, houve uma boa resposta ao tratamento superovulatório utilizando o pFSH, resultados semelhantes aos encontrados por D'Alessandro et al. (2005) e superiores aos encontrados por Folch et al. (2001). Este fato demonstra que a variação do peso da doadora de embriões ou a redução da dose de pFSH não influenciou na porcentagem de ovelhas responsivas ao tratamento superovulatório.

Outro fator importante para a MOTE é a qualidade das ovulações e, conseqüentemente, dos CL, os quais, tornam-se funcionais e capazes de produzir quantidades de progesterona acima de 1,0 ng/mL, mantendo a sanidade e o desenvolvimento embrionário (SAHARREA et al., 1998). A qualidade do CL pode ser observada principalmente pela coloração deste, a qual, quanto mais pálida, menor é a qualidade da estrutura luteal. É comum em protocolos de superovulação, principalmente quando a eCG é utilizada, observarmos uma regressão prematura de CL, a qual é causada pela liberação precoce de PGF2 $\alpha$ , originária, por sua vez, de folículos estimulados, mas que não ovularam ou, ainda, das glândulas endometriais, em resposta ao

prolongado estímulo de elevados níveis circulantes de estrógenos (BATTYE et al., 1988). Em nosso experimento, foi observado um reduzido número médio de CL com baixa qualidade e de folículos grandes persistentes, com média geral de  $0,75 \pm 2,33$  e  $0,55 \pm 0,8$ , respectivamente. Menchaca et al.(2009) constataram em seu experimento que ao se utilizar a eCG ao final do tratamento com pFSH, ocorre uma redução no número de embriões e na taxa de fertilização destes, devido à redução da qualidade das ovulações, quando comparado ao tratamento utilizando somente pFSH. Portanto, fica claro que a utilização da eCG ao final do tratamento é desnecessária e causa prejuízos à produção de embriões.

A tabela 9 mostra a superioridade dos animais que receberam 200 mg comparados com aqueles que receberam 128 mg em relação ao número de estruturas colhidas( $P<0,05$ ). Desta forma, houve uma redução média de, aproximadamente, 3 estruturas colhidas para os animais que receberam 128 mg (Tabela 9). Redução semelhante foi observada por Boscós et al. (1997), ao reduzirem a dose de pFSH em ovelhas Chio.

O número total médio de embriões e a taxa de fertilização foram semelhantes entre os grupos (Tabela 9), não sofrendo influência da dose de pFSH e do peso vivo das doadoras. Nossos resultados foram inferiores aos encontrados por Wu et al. (2011), que tiveram média de, aproximadamente, 10 embriões, utilizando 150 ou 120 mg de pFSH. Entretanto, Bartlewski et al. (2008) obtiveram resposta inferior ao nosso experimento, com média de 4,1 embriões, utilizando 250 mg de pFSH, o que demonstra que não há uma resposta proporcional à dose total de pFSH e que a produção embrionária pode ser influenciada negativamente pelo hiperestrogenismo provocado por altas doses de pFSH (KATANYA et al., 2009).

Como, dentre outros fatores (status folicular, produção de FSH endógeno, época do tratamento, raça utilizada) (AMMOUN et al., 2006; BARTLEWSKI et al., 2008; BETTENCOURT et al., 2008; BARTLEWSKI et al., 2009; MENCHACA et al., 2010), a produção de embriões está relacionada também à dose de gonadotrofina exógena utilizada, a utilização de doses exageradas de FSH não traz grandes benefícios, tanto com relação ao aspecto econômico, elevando os custos da produção *in vivo* de embriões, quanto no tocante à resposta hipotalâmico-hipofisária-ovariana individual, a qual deve ser

considerada. Portanto, é necessária uma redução ainda maior na utilização do pFSH, o que pode ser alcançado ao se aliar o controle da dinâmica ovariana aos protocolos hormonais, evitando a presença de folículos dominantes que inibam o recrutamento de novos folículos (MENCHACA et al., 2010).

O principal resultado de um programa de MOTE é o número médio de embriões transferíveis, quando os embriões são destinados à transferência a fresco, ou de embriões congeláveis, quando os embriões são destinados à criopreservação. Nosso experimento demonstrou que não houve efeito da redução de pFSH sobre o número médio de embriões transferíveis e congeláveis. Desta forma, podemos propor a utilização de 128 mg pFSH em ovelhas Dorper, promovendo, conseqüente melhora da relação custo/benefício desta biotecnologia, tendo em vista que pFSH tem grande impacto nos custos de produção de embriões *in vivo*.

## 8. Conclusões

Podemos concluir que houve uma redução na taxa de ovulação das ovelhas leves que receberam 128 mg de pFSH quando comparadas as ovelhas pesadas que receberam 200 mg. O estro dos animais que receberam 200 mg de pFSH foi mais precoce em relação aos animais tratados com 128 mg. O total de estruturas coletadas foi menor quando houve uma redução de pFSH de 200 mg para 128 mg. A produção de embriões transferíveis e congeláveis não foi influenciado pela redução da dose de pFSH de 200 para 128 mg. É viável a redução da dose de pFSH. Além disso, o fator peso vivo da doadora de embriões não interfere na produção de embriões. É necessário desenvolver mais estudos observando o efeito da redução de pFSH em outras raças ovinas e em diferentes épocas do ano, pois a produção de FSH endógeno pode interferir no resultado final.

## 9. Referências Bibliográficas

ABCDOPER. **A história do Dorper**. Disponível em: <http://abcdorper.com.br/a-raca-dorper/> Acessado em: Fevereiro de 2013.

AL-KAMALI, A.A.; BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotropin treatment. **Veterinary Record**, v.116, n.7, p.180-1, 1985.

ALVAREZ, R. H. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. In: IX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa, p. 32, 1994.

AMMOUN, I.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J.M.; CONTRERAS, I.; GONZALEZ-AÑOVER, P.; COCERO, M.J.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**, v. 66, p. 896–905, 2006.

ANDRIOLI, A.; SIMPLICIO, A.A.; SOARES, A.T.; VISINTIN, J.A. Efficiency and effect of consecutive embryo recoveries on the reproductive system of goat donors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences**, v. 36, p. 1-16, 1999.

ANTONIOLLI, C. B. Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação. 2002. Disponível em: <http://vetarquivos.blogspot.com/2009/10/desenvolvimento-folicularondas.html>

ASHWORTH, C.J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 99-105, 1995.

ASSISTAT, versão 7.6 Beta, Campina Grande – Paraíba, 2011.

BAIRD, D.T. ; CAMPBELL, B.K. ; MANN, G.E. ; MCNEILLY, A.S. Inhibin and estradiol in the control of fsh-secretion in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p.125-138, 1991.

BARI, F.; KHALID, A. M.; HARESIGN, B. W.; MURRAY, C. A.; MERRE, B. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a moet program in sheep **Theriogenology**, v. 53, p. 727-742, 2000.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. Manual de Formación Práctica para el Trasplante de Embriones en Ovejas y Cabras. **FAO**, Roma, 182p, 1995.

BARROS, N. N.; VASCONCELOS, V. R.; WANDER, A. E.; ARAÚJO, M. R. A. Eficiência bioeconômica de cordeiros F1 Dorper x Santa Inês para produção de carne. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 825-831, 2005.

BARTLEWSKI, P.M.; ALEXANDER, B.D.; KING, W.A. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. **Small Ruminant Research**, v. 75, p. 210–216, 2008.

BARTLEWSKI P.M.; FUERST K.J.; ALEXANDER B.D.; KING W.A. Systemic Concentrations of Endogenous and Exogenous FSH in Anoestrous Ewes Superstimulated with Follitropin<sub>-V</sub>, Short Communication. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44, p. 353–358, 2009.

BATTYE, K. M.; FAIRCLOUGH, R. J.; CAMERON, A. W. N.; TROUNSON, A. O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat. (*Capra hircus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p.425-430, 1988.

BETTENCOURT, E.M.; BETTENCOURT, C.M.; CHAGAS E SILVA, J.; FERREIRA, P.; MANITO, C.I.; MATOS, C.M.; ROMÃO, R.J.; ROCHA, A. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 134–139, 2008.

BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 15, 2003. Porto Seguro – BA. **Anais...** Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.

BLANCO, M.R.; SIMONETTI, L.; RIVERA, O.E. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 183-191, 2003.

BOSCOS, C.; VAINAS, E.; KOUSKOURA, TH.; SAMARTZI, F.; VAFIADIS, D.; DELLIS S. Superovulatory Response of Chios and Friesian Ewes to Two FSH-P Dose Levels. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p. 195-198, 1997.

BRAND, T. S. Grazing behaviour and diet selection by Dorper sheep. **Small Ruminant Research**, v. 36, p. 147-158, 2000.

CAMPBELL, B. K.; DOBSON, H.; BAIRD, D. T.; SCARAMUZZI R. J. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p. 355-367, 1999.

CLOETE, S. W. P.; SYNMAN, M. A.; HERSELMAN, M. J. Productive performance of Dorper sheep. **Small Ruminant Research**, v. 36, p. 119-135, 2000.

COGNIE Y.; BARIL G.; POULIN N.; MERMILLOD P. Current status of embryo technologies in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 59, p. 171–188, 2003.

CROSBY, T.F. Superovulation in sheep : The effects of pFSH type and ewe breed. **Theriogenology**, v. 39, p.205, 1993.

D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; TOTEDA, F.; GAMBACORTA, M.; MANCHISI, A. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. **Small Ruminant Research**, v. 19, p. 255-261, 1996.

D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**, v. 63, p. 1764–1774, 2005.

EDWARDS, L.J.; MCMILLEN, I.C. Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. **American**

**Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.283, p.669–R679, 2002.

ELIAS, E.; COHEN, D.; DAYENOFF, P. Characteristics and indices of reproduction in Dorper sheep. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 56, n. 3, p. 127-130, 1985.

ESPINOZA-VILLAVICENCIO, J. L.; PÉREZ, R. O.; ESPINOSA, A. P.; MÉNDEZ, J. V.; FLORES, C. F. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. **Interciencia**, v. 32, n. 2, 2007. Disponível em: [http://www.interciencia.org/v32\\_02/93.pdf](http://www.interciencia.org/v32_02/93.pdf)

EVANS, A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 3, n. 78, p. 289 - 306, 2003.

FERNANDES, C. A. C. Superovulação em bovinos. Alfenas-MG, 2003. Disponível em: < [www.beefpoint.com.br](http://www.beefpoint.com.br) > Acesso em: 25 set. 2012.

FLYNN, J.D.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O. Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 4, p. 285 - 296, 2000.

FOLCH, J.; RAMON, J.P.; COCERO, M.J.; ALABART, J.L; BECKERS, J.F. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. **Theriogenology**. v. 55, p. 1777-1765, 2001.

FORCADA, F.; ABECIA, J.A.; LOZANO, J.M.; ZÚÑIGA O. Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. **Livestock Production Science**, v. 66, p. 263–269, 2000.

FORCADA, F.; AMER-MEZIANE, M.; ABECIA, J.A.; MAUREL, M.C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T.; ASENJO, B.; VÁZQUEZ, M.I.; CASAO, A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 769–776, 2011.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O. Differentiation of dominant versus subordinate in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, n. 3, p. 648 - 654, 2001.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187 - 1194, 1996.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA, R.; SOUZA, C.; SANTIAGO, M.; MORENO, J.; LOPEZ S. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 357-361, 2002.

GORDON, I. Artificial control of oestrus and ovulation. In: GORDON, I. **Controlled Reproduction in Sheep and Goats**. v. 2. New York: CAB International, Cap. 3, p. 86 – 109, 1997.

GREEFF, J.C.; WYMA, G.A.; BEZUIDENHOUT, H. Differences in ovulation rate, embryo loss and litter size among Romanov, Dorper and F1-crosses (in Afrikaans). **South African Journal of Animal Science**. v. 29, p. 4-10, 1990.

HARESIGN, W. Manipulation of reproduction in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 45, p. 127-139, 1992.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINS, Y. Hormônios, Fatores de crescimento e Reprodução. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole. Cap.3. p.33-54, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Ciclos reprodutivos. In: \_\_\_\_\_ **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole. Cap.4. p.55-67, 2004.

HUNTER, G.L.; ADAMS, C.E.; ROWSON, L.E. Inter-bred ovum transfer in sheep. **Journal of Agriculture and Science**, v. 46, p. 143-149, 1955.

ISHWAR, A .K.; MEMON, M. A . Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v. 19, p. 35-46, 1996.

KATANYA, J. F.; PAWEL, M. B.; KING, W.A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in

anestrous ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v. 82, p. 144–148, 2009.

MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAUJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO J.R.. Role of Follicle Stimulating Hormone in folliculogenesis in vivo and in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.171-182, 2009.

MALHADO, C. H. M.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; SOUZA JR., A. A. O.; SARMENTO, J. L. R. Growth curves in Dorper sheep crossed with the local Brazilian breeds, Morada Nova, Rabo Largo, and Santa Inês. **Small Ruminant Research**, v. 84, p. 16-21, 2009.

MARTÍNEZ, J.J.; IZAGUIRRE, F.; SÁNCHEZ, L. Comportamiento reproductivo de ovejas Barbados Barriga Negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. **Revista Científica**, v.17, p.47-52, 2007.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2178–2180, 2002.

McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; SINCLAIR, K.D. Feed and forage toxicant affecting embryo survival and fetal development. **Theriogenology**, v.55, p.113–129, 2001

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

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDANÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and day 0 protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 477 – 483, 2009.

MILNE, C. The history of the Dorper sheep. **Small Ruminant Research**, V. 36, p.99-102, 2000.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1. ed. São Paulo: Varela. Cap.2, p.25-55, 2002.

NAQVI, S.M.K.; GULYANI, R.; JOSHI, A.; DAS, G.K.; MITTAL, J.P. Effect of dietary regimens on ovarian response and embryo production of sheep in tropics. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 167–171, 2002.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants**. 7th ed. Washington: National Academic Press, 2007. 408p.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 303–313, 2000.

OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Laparoscopy in the ewe: a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 119-124, 1980.

OLIVEIRA, R.P.M.; OLIVEIRA, F.F. Manipulação do ciclo estral em ovinos. **PUBVET**, v. 2, n. 7, Fevereiro de 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=146>>.

OLIVEIRA, V.S.; GONZALES, C.I.M. Transferência de embriões em caprinos. I Simpósio nordestino sobre caprinos e ovinos deslanados. 21-32p, 1992.

PIMENTEL, C. M. M.; PAIVA S. R.; ARAÚJO R. O.; LOUVANDINI, H. Aspéctos genéticos de produção de ovinos. In: Voltolini, T. V. **Produção de Caprinos e Ovinos no Semiárido**, EMBRAPA, p. 459-488, 2011.

PLAISANT M.O. Neuro-endocrinologia: Sistema diencéfalohipofisário. In: **Endocrinologia Ginecológica**. Rio de Janeiro, Ed. Pesquisa. 27-66, 1973

QUAN, F.; ZHANG, Z.; AN, Z.; HUA, S.; ZHAO, X.; AND ZHANG, Y. Multiple Factors Affecting Superovulation in Poll Dorset in China. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 39–44, 2011.

RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W.; DEATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41–49, 1995.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certification and identification of embryos. In: D.A. Stringfellow; S.M. Seidel (eds.), **Proceedings of Guide of International Embryo Transfer Society**, p. 109-122, 2010.

ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v.126, p. 259–276, 2006.

ROSANOVA, C.; SILVA SOBRINHO, A. G.; GONZAGA NETO, S. A raça Dorper e sua caracterização produtiva e reprodutiva. **Veterinária Notícias**, v. 11, n. 1, p. 127-135, 2005.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiología reproductiva em cabras y ovejas. In: SIMPOSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000 São Paulo. **Anais...São Paulo: UFMZ/USP**. p. 255 - 282, 2000.

RUBIANES E.; MENCHACA, A. 2006. Dinâmica folicular, sincronização do estro e superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Supl 1) p. 251 - 261, 2006.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑOLES, C.; RIVERO, A.; ADAMS, G.P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**. v. 47, p. 1479-1488, 1997.

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEDJA, O.; CERBÓN, J.L.; CABALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats

superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**, v.50, p.1039-1052, 1998.

SALEHI, R.; KOHRAM, H.; TOWHIDI, A.; KERMANI MOAKHAR, H.; HONARVAR M. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 213–217, 2010.

SCHOEMAN, S.J.; WET, R. Assesment of the reproductive and growth performance of two sheep composites, developed from the Finnish Landrace, compared to the Dorper. **South African Journal of Animal Science**, v. 23, n. 5, p. 207-210, 1993.

SCHOEMAN, S.J.; BURGER, R. Performance of Dorper sheep under an accelerated lambing system. **Small Ruminant Research**, v. 9, p. 265-281, 1992.

SELVARAJU, S.; AGARWAL, S.K.; KARCHE, S.D.; MAJUMDAR, A.C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats. **Theriogenology**, v. 59, p. 1459-1468, 2003.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA M. A. L.; COSTA, S. H. F.; FIGUEIREDO, J. R. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v. 2, n.12, p. 105 - 117, 2002.

SOUSA, W. H.; LEITE, P. R. M. **Ovinos de corte: a raça Dorper**. João Pessoa: Emepa-PB, 75p. 2000.

SPICER, L. J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 251–270, 2001.

URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M.I.L. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterone (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.40, p.83-88, 2008.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; DOMINGUEZ, V.; COCERO, M.J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v. 63, p. 1973–1983, 2005.

WU, W.; HANIKEZI; YANG, M.; GONG, P.; WANG, F.; TIAN, Y.; XU, X; FU, X.; HAQIKEZI; TIAN, K.; GUO, Z. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 10, n.70, p. 15834-15837, 2011.

YAAKUB, H.; WILLIAMS, S.A.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effect of dietary intake and glucose infusion on ovulation rate and embryo quality in superovulated ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.19, p. 151, 1997.