



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

Mayara de Souza Miranda

**EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE RESÍDUO SECO DE
UVA (*Vitis vinifera*) NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES
DE OVELHAS DESLANADAS EXPLORADAS NO
SEMIÁRIDO DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

Petrolina – PE
2014

Mayara de Souza Miranda

**EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE RESÍDUO SECO DE
UVA (*Vitis vinifera*) NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES
DE OVELHAS DESLANADAS EXPLORADAS NO
SEMIÁRIDO DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

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

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior.

Co-Orientadores: Prof^a. Dr^a. Elenice Andrade Moraes e Prof^a. Dr^a. Mabel Freitas Cordeiro

Petrolina – PE
2014

	Miranda, Mayara de Souza
M672e	Efeito de diferentes níveis de resíduo seco de uva (<i>vitís vinífera</i>) na produção <i>in vivo</i> de embriões de ovelhas deslanadas exploradas no semiárido do submédio São Francisco / Mayara de Souza Miranda. -- Petrolina, 2014. 63f.: il.; 29 cm.
	Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2014. Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior. Referências. 1. Uvas – Qualidade embrionária. 2. Ovelhas. 3. Produção Animal. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.
	CDD 636.082

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF
Bibliotecária – Ana Cleide Lucio Pinheiro

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayara de Souza Miranda

EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE RESÍDUO SECO DE UVA (*Vitis vinifera*) NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES DE OVELHAS DESLANADAS EXPLORADAS NO SEMIÁRIDO DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO

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

Aprovada em: ___ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Edilson Soares Lopes Júnior, Dr., Universidade Federal do Vale do São Francisco

Elenice Andrade Moraes, Pós-Doutora, Universidade Federal do Vale do São Francisco

Mabel Freitas Cordeiro, Pós-Doutora, Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina
2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Enebite, e aos meus irmãos, Edilane e Lucas, pelo apoio desmedido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me trazer até aqui, segurando-me pela mão ou carregando-me nos braços.

À minha mãe (Enedite), que se manteve ao meu lado em todas as minhas decisões, me incentivando com sorrisos, palavras e orações, que foram essenciais ao meu crescimento pessoal e profissional.

A meu pai (Edmundo), pelo apoio e pela torcida.

Aos meus irmãos (Edilane e Lucas), por compartilharem comigo os momentos bons e por me ajudarem a transformar os momentos ruins em mais degraus para a minha subida. Por acreditarem que eu ia “vencer apesar das dificuldades”.

Ao meu avô (Pedro), meus tios (as), primos (as), que torceram sempre pelo meu sucesso.

Ao meu namorado (José Alfredo), que, mesmo em pouco tempo, já se tornou uma parte enorme de mim. Obrigada pelo cuidado, pela proteção, por chorar o meu pranto, por rir o meu riso.

Ao meu orientador e grande amigo (Edilson), pela amizade, confiança, apoio desmedido, proteção. Por me pegar pela mão há mais de quatro anos atrás e me trazer até aqui.

À minha amiga, professora Mabel, pelo incentivo, por “botar a mão na massa” junto comigo sempre que precisei, por me ensinar muito sobre a minha profissão e sobre a vida.

À atual e antiga equipe do LAFIBRA (Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal), que esteve comigo durante essa caminhada, que foi mais que uma equipe de trabalho, foi uma verdadeira família que me ajudou a executar os

meus projetos profissionais e projetos de vida. Lívia, Alane, Thaís, Aionne, Ludmila, vocês se tornaram irmãs. Yane, Jonathan, Thiago, Natalia e Cintia, eu aprendi muito com vocês. Ana, Adriano e Hícaro, os meus filhos acadêmicos, meus amigos, meus pupilos, que me fizeram despertar para a docência, com quem aprendi muito mais do que ensinei.

À Bacharel em Medicina Veterinária Thaís Jobard e a Equipe do setor de ovinocultura (Maércio, Flávio, Rodrigo, Uilbor, Marcela) pelo apoio na execução do projeto.

Aos professores Daniel Menezes e Mário Queiroz por sanarem as minhas dúvidas, e não medirem esforços para isso, bem como a todos os professores que participaram da minha formação. E aos mestres Allan Leandro e Percivaldo Resende pelo suporte à execução de parte do projeto.

Ao professor Luis Maurício Cavalcante Salviano, por ceder os animais e fomentar parte do trabalho.

À Fazenda FRUTNALLI e a Mirele, pela concessão da uva utilizada no experimento.

Aos meus amigos Dani, Kéu, Saane, Tamy, Cris, Lú, Lay, Heidy, Fá, Thi, Perci, Allan, Wasley, Gabí e Mari, os irmãos que Deus me permitiu escolher e ser escolhida. Por entender a minha ausência, me proporcionar bons momentos. Pela torcida, por acreditarem em mim.

Obrigada a todos que, de alguma forma, participaram da realização deste sonho.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

Per ardua surgo

RESUMO

A fim de avaliar o efeito de diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva sobre a produção *in vivo* de embriões em ovelhas exploradas no Submédio São Francisco, foram selecionadas 20 ovelhas deslanadas, as quais foram igualmente distribuídas em quatro grupos. As ovelhas foram alimentadas a uma proporção de 60:40 de volumoso:concentrado, onde a base do concentrado era farelo de milho e de soja (75% e 25%, respectivamente) e os grupos se diferenciaram pela quantidade de resíduo de uva que era incluído em substituição ao concentrado. No primeiro (Controle), as ovelhas receberam suplementação à base de farelo de milho e de soja; os animais dos grupos UVA10, UVA20 e UVA30, receberam 10, 20 e 30% de resíduo de uva em substituição parcial do concentrado. Os estros das ovelhas foram sincronizados com CIDR, por 12 dias e as fêmeas foram superovuladas com 128 mg de pFSH, com início 48 horas antes do final do tratamento com progesterona, divididas em seis doses decrescentes (32/32; 16/16; 16/16 mg), em intervalos de 12 horas. Os animais foram submetidos à colheita de embriões por laparotomia. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e submetidos à Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan e os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Qui-quadrado. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos Controle, UVA10, UVA20 e UVA30 para os parâmetros: intervalo entre a retirada do CIDR e o início do estro; número de corpos lúteos (taxa de ovulação); número de estruturas recuperadas; taxa de recuperação; taxa de fecundação; qualidade e retração de massa embrionária. A proporção de embriões homogêneos, com relação à cor, foi maior no Grupo UVA30 ($P < 0,05$) que no Grupo UVA10, mas foi semelhante aos Grupos Controle e UVA20. O Grupo UVA30 apresentou uma maior proporção de embriões sem extrusão e maior quantidade de embriões homogêneos, com relação ao tamanho dos blastômeros, do que os demais grupos ($P < 0,05$). O resíduo da uva não é capaz de promover melhorias quantitativas e qualitativas na resposta ovariana e produção embrionária, mas mostrou-se capaz de melhorar características morfológicas dos embriões. Além disso, não traz efeitos negativos aos parâmetros reprodutivos de modo geral. Portanto, o resíduo de uva pode ser utilizado, como fonte alimentar alternativa, para ovelhas submetidas à produção *in vivo* de embriões, elevando a qualidade dos mesmos.

Palavras-chave: qualidade embrionária, ovino, subproduto de fruta, superovulação

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of different levels of inclusion of grape residue on the in vivo production of embryos in sheep Submédio exploited in San Francisco flour, 20 woolless sheep, which were equally divided into four groups were selected. The sheep were fed a 60:40 forage to concentrate where the concentrate base was ground corn and soy (75 % and 25 %, respectively) and the groups differentiated by the amount of grape residue which was included replacing the concentrate. In the first (control), the sheep were supplemented based on ground corn and soy, the animals in groups UVA10 , UVA20 and UVA30 , received 10 , 20 and 30 % residual grape in partial replacement of concentrate. The oestrus ewes were synchronized with CIDR for 12 days and females were superovulated with 128 mg of pFSH, beginning 48 hours before the end of treatment with progesterone divided into six decreasing doses (32/ 32, 16/16, 1 /16 mg) every 12 hours. The animals underwent laparotomy for embryo collection. Results were expressed as mean \pm SEM and subjected to ANOVA. Means were compared by Duncan test and the data expressed as percentages were subjected to Chi-square test. There was no significant difference ($P>0.05$) between the control, UVA10, UVA20 and UVA30 groups for the parameters : interval from CIDR removal and the onset of estrus, number of corpora lutea (ovulation rate), number of structures recovered, recovery rate, fertilization rate, embryo quality and reduction of dough. The proportion of embryos homogeneous with respect to color, was higher in UVA30 group ($P<0.05$) than in Group UVA10 , but was similar to control groups and UVA20 . The UVA30 group had a higher proportion of embryos without extrusion and greater amount of homogeneous embryos, relative to the size of blastomeres, than the other groups ($P<0.05$). The residue of the grape is not able to make quantitative and qualitative improvements in ovarian response and embryo production but proved capable of improving morphological characteristics of embryos. Furthermore, no negative brings the reproductive parameters general purposes. Therefore, the residue of grape can be used as an alternative food source for sheep subjected to in vivo production of embryos, increasing their quality .

Keywords : embryo quality , sheep , fruit byproduct of superovulation

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Raças ovinas exploradas na região Nordeste do Brasil. (A) Morada Nova; (B) Santa Inês; (C) Bergamácia; (D) Crioula; (E) Dorper; (F) Somalis; (G) Rabo Largo (Fonte: www.caprileite.pib.com.br).....	20
Figura 2 – Códigos numéricos de estágio de desenvolvimento embrionário. 1 = embrião não fecundado ou embrião de 1 célula; 2 = embriões com 2 a 16 células; 3 = mórula inicial; 4 = mórula compacta; 5 = blastocisto inicial; 6 = blastocisto; 7 = blastocisto expandido; 8 = blastocisto em eclosão; 9 = blastocisto eclodido em expansão (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).....	32
Figura 3 – Graus de qualidade embrionária: (A) Grau 1 – Excelente; (B) Grau 2 – Regular; (C) Grau 3 – Pobre 3; (D) Grau 4 – morto ou degenerado (Fonte: Arquivo Pessoal).....	34
Figura 4. Esquema do protocolo hormonal para sincronização de estro e superovulação.....	44
Figura 5 – Classificação morfológica embrionária, quanto à homogeneidade da massa celular interna: (A) Homogênea, (B) Levemente Heterogênea, (C) Heterogênea (Fonte: Arquivo Pessoal).....	47
Figura 6 – Classificação morfológica embrionária, quanto à extrusão da massa celular interna: (A) Baixa – 0 à 5%, (B) Média – 6 à 15%, (C) Alta – >15%, (Fonte: Arquivo Pessoal).....	47
Figura 7 – Classificação morfológica embrionária, quanto à extrusão da massa celular interna: (A) Sem retração, (B) Levemente retraída, (C) Com retração (Fonte: Arquivo Pessoal).....	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Estádios embrionários e suas respectivas características morfológicas (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).....	31
Tabela 2 – Sobrevivência embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Adaptado de Oliveira, 2009).....	33
Tabela 3 – Qualidade embrionária e suas respectivas características (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).....	33
Tabela 4 – Sobrevivência embrionária de acordo com a qualidade dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Adaptado de Oliveira, 2009).....	35
Tabela 5 – Alimentos utilizados na formulação das rações para cada grupo experimental e suas respectivas proporções.....	42
Tabela 6 – Composição bromatológica da ração nos diferentes grupos experimentais.....	43
Tabela 7 – Valores médios (\pm e.p.) do intervalo entre a retirada do CIDR e início do estro (RCIDR-IE; h), números de corpos lúteos (CL), de estruturas recuperadas (embriões + oócitos), de embriões encontrados, bem como valores percentuais de taxas de recuperação e de fecundação de ovelhas deslanadas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (<i>Vitis vinifera</i>) e submetidas à produção <i>in vivo</i> de embriões.	49
Tabela 8 – Graus de qualidade de embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (<i>Vitis vinifera</i>).....	50

Tabela 9 – Percentual de retração da massa de embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (<i>Vitis vinifera</i>).....	51
Tabela 10 – Porcentagem de homogeneidade da massa embrionária com relação ao tamanho dos blastômeros de embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (<i>Vitis vinifera</i>).....	51
Tabela 11 – Porcentagem de homogeneidade da massa embrionária com relação à cor dos blastômeros de embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (<i>Vitis vinifera</i>).....	52
Tabela 12 – Proporção de embriões sem extrusão de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (<i>Vitis vinifera</i>).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
Ba	Bahia
Be	Blastocisto eclodido
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
Bn	Blastocisto em eclosão
Bx	Blastocisto expandido
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CL	Corpo lúteo
CIDR	Controlled Internal Drug Release (dispositivo interno de liberação controlada)
cm	Centímetro
CQBAL	Composição Química e Bromatológica dos Alimentos
eCG	Equine Chorionic Gonadotropin (Gonadotrofina Coriônica Equina)
FPO	Folículo pré-ovulatório
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
oFSH	Ovine Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante Ovino)
pFSH	Porcine Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante Suíno)
GnRH	Gonadotrophin Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
g	grama
hMG	Human Menopausal Gonadotrophin (Gonadotrofina Menopáusica Humana)
IA	Inseminação artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IETS	International Embryo Transfer Society (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões)
kg	Quilograma
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)

Mc	Mórula compacta
mg	Miligrama
Mi	Mórula inicial
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embriões
P ₄	Progesterona
Pe	Pernambuco
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Fosfato-Tamponada)
PV	Peso Vivo
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
UI	Unidades internacionais
T	Tonelada
TE	Transferência de embriões

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. Revisão bibliográfica.....	20
2.1. Caracterização dos ovinos deslanados do Nordeste brasileiro.....	20
2.2. Fisiologia da reprodução de fêmeas ovinas.....	21
2.3. Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	23
2.3.1. Sincronização do estro e da ovulação.....	23
2.3.2. Tratamentos hormonais de superovulação.....	25
2.3.3. Métodos de fecundação das doadoras de embriões.....	27
2.3.4. Métodos de colheita de embriões.....	28
2.3.5. Avaliação e classificação dos embriões.....	30
2.3.6. Fatores que influenciam a produção <i>in vivo</i> de embriões.....	35
3. Justificativa.....	39
4. Objetivos.....	40
4.1. Objetivo geral.....	40
4.2. Objetivos específicos.....	40
5. Material e métodos.....	41
5.1. Ética animal.....	41
5.2. Local de execução.....	41
5.3. Animais experimentais.....	41
5.4. Delineamento experimental e tratamentos alimentares.....	42
5.5. Tipo, obtenção e processamento do subproduto da uva.....	43
5.6. Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	44
5.6.1. Tratamentos hormonais.....	44

5.6.2. Detecção de estro e fecundação.....	44
5.6.3. Avaliação da resposta ovulatória.....	45
5.6.4. Colheita de embriões.....	45
5.6.5. Avaliação de embriões.....	46
5.7. Parâmetros avaliados.....	48
5.8. Análise estatística.....	48
6. Resultados.....	49
7. Discussão.....	53
8. Conclusões.....	57
9. Referências.....	58

1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino apresenta acentuado desenvolvimento em toda região Nordeste, principalmente nas cidades de Petrolina-PE e Juazeiro-BA, as quais comportam cerca de 200 mil ovinos dos 9,56 milhões criados no nordeste brasileiro (IBGE, 2010). Isto é reflexo da excelente rusticidade e adaptabilidade das raças ovinas deslanadas nativas do Brasil. Além disso, o mercado consumidor desperta cada vez mais interesse por carnes de melhor qualidade, as quais são encontradas a partir de animais que vão para o abate precocemente.

No semiárido nordestino, há predominância da exploração de animais deslanados, devido a sua capacidade em adaptar-se ao clima pouco favorável e a diferentes sistemas de criação e pastagens. Somado a isto, as ovelhas da região possuem boa conformação de carcaça, bem como excelentes fertilidade, prolificidade e precocidade, desde que exploradas em condições adequadas (SILVA et al., 2004).

Contudo, visando acelerar o melhoramento genético, faz-se necessário o uso das biotécnicas da reprodução, como ferramenta para maximizar os índices produtivos e reprodutivos. Dentre elas, tem-se lançado mão da Inseminação Artificial (IA) e da Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE). Esta última é uma técnica que permite eficácia na seleção dos animais geneticamente superiores, devido ao fato de reduzir o intervalo entre gerações, aumentando, assim, a multiplicação destes indivíduos (SALLES, SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000). Porém, os tratamentos hormonais são de suma importância para induzir a superovulação nas doadoras, as quais deverão produzir o máximo possível de embriões e estes deverão ser classificados quanto à qualidade e estágio embrionário.

No entanto, para que as biotécnicas da reprodução, inclusive a MOTE, sejam eficazes no seu objetivo, destaca-se, dentre outros fatores, a adequada nutrição dos animais, a qual possui ligação direta com a fertilidade, devido ao aporte de nutrientes, o que é essencial para desenvolvimento folicular, maturação e fecundação oocitária, desenvolvimento embrionário, manutenção das concentrações séricas de hormônios e outros metabólitos, que, por sua vez, são necessários para manter a gestação dos ruminantes (McEVOY et al., 2001). Dentre estes hormônios ligados à reprodução, temos os hormônios proteicos, Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), e também os esteroides, os quais são produzidos à base de colesterol (SCARAMUZZI et al., 2006).

Os animais criados na região Nordeste, principalmente no Submédio São Francisco, apresentam sérios problemas nutricionais, pois as chuvas são irregulares e concentradas em alguns meses do ano, levando à escassez de alimento por longos períodos. Contudo, devido à produção irrigada da fruticultura local manter-se constante, o subproduto das frutas produzidas na região tem sido uma alternativa para a alimentação animal, com destaque para o resíduo. Existem várias frutas que produzem resíduo durante sua industrialização. Dentre elas, temos a manga, o abacaxi, o melão, a goiaba, a acerola e o coco. Devido ao acentuado crescimento do plantio e da produção na região, a uva ganha destaque por produzir grande quantidade de resíduo, o qual apresenta níveis protéicos razoavelmente elevados. Além disso, apresenta altas concentrações de tanino, encontrado principalmente na semente (ROTAVA, 2007). E, de acordo com Liu et al. (2011), o tanino condensado tem ação antioxidante, reduzindo peroxidação lipídica. Além disso, o fornecimento de alimento com alto teor de tanino condensado promove aumento do escore de condição corporal e redução de perdas embrionárias (RAMÍREZ et al., 2005).

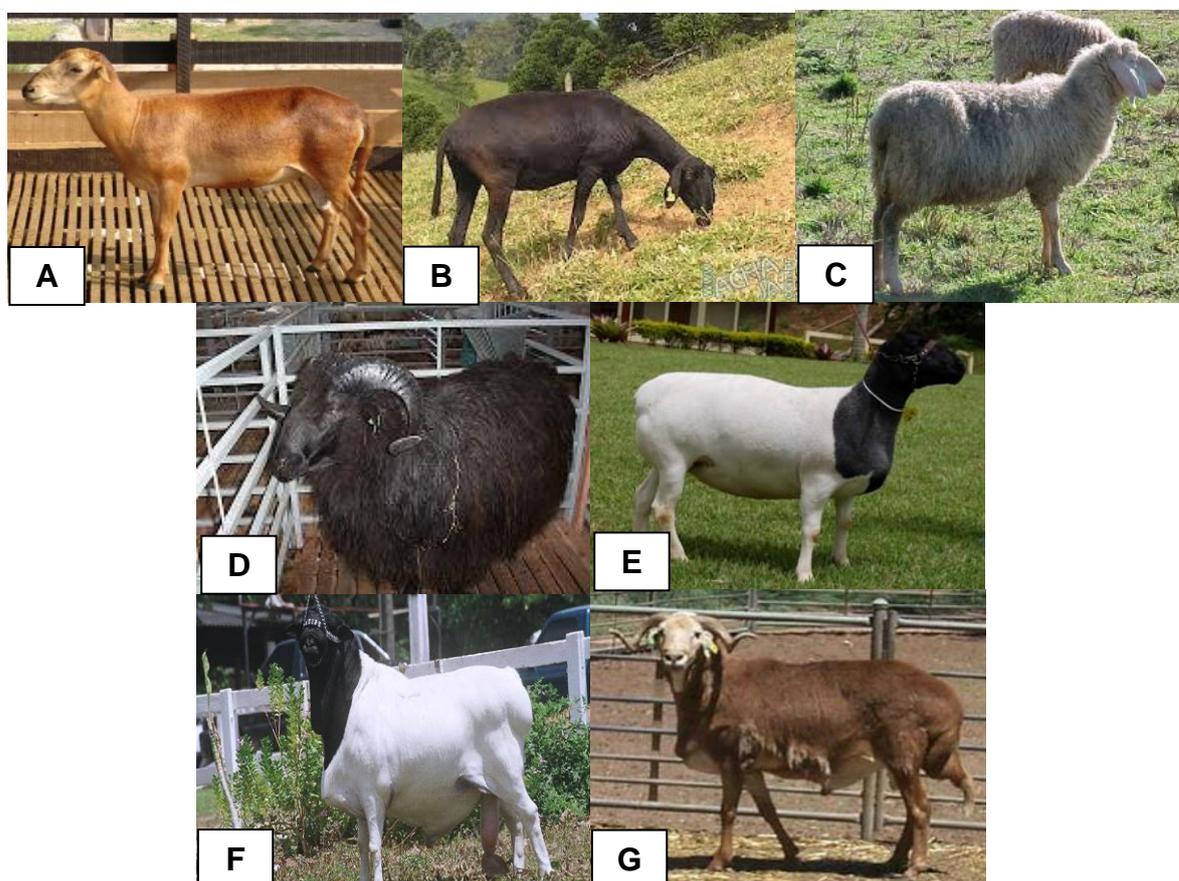
Pesquisas ainda são escassas com relação ao efeito do resíduo das frutas, principalmente da uva, sobre parâmetros reprodutivos de fêmeas ovinas. Assim, sabendo da falta de alimentação durante longo período do ano e da grande oferta de resíduo oriundo da fruticultura local, torna-se necessário realizar estudos sobre a composição e os efeitos desse subproduto na alimentação animal. Isto pode reduzir os custos com alimentação e elevar os índices reprodutivos devido à presença de alguns compostos destes resíduos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização dos ovinos deslanados do Nordeste brasileiro

O Nordeste do Brasil conta com a produção de diversas raças ovinas deslanadas (Figura 1), dentre elas, as raças Morada Nova e Santa Inês, que merecem destaque por serem animais adaptados ao clima tropical da região devido a sua alta rusticidade.

Figura 1. Raças ovinas exploradas na região Nordeste do Brasil: (A) Morada Nova; (B) Santa Inês; (C) Bergamácia; (D) Crioula; (E) Dorper; (F) Somalis; (G) Rabo Largo (Fonte: www.caprileite.pib.com.br)



Os animais da raça Morada Nova apresentam boa aptidão para carne e pele. São animais de pequeno porte, não apresentam chifres, possuem tórax profundo, coxas musculosas e os pelos rasos, finos e ásperos (Figura 1A). São considerados como uma importante fonte de proteína na alimentação de pequenos ovinocultores no semiárido nordestino (LAIZA, 2012).

A raça Santa Inês é uma das mais utilizadas, seja em sistema extensivo seja semi-intensivo. É nativa do Nordeste brasileiro, sendo proveniente de cruzamentos alternados com raças mais antigas, tais como a Morada Nova, Bergamácia e Crioula. A sua difusão em grande parte do Nordeste brasileiro é devida a sua rusticidade, produtividade e habilidade materna em qualquer clima do Brasil. Outro fator que contribuiu para sua disseminação é a característica de duplo propósito, produzindo tanto carne quanto pele (SILVA et al., 2004). Os ovinos desta raça apresentam grande porte, sendo que os machos adultos apresentam massa corpórea de 80 a 100 kg, enquanto as fêmeas, 60 a 80 kg, com excelente qualidade de carne e baixo teor de gordura (Figura 1B). Além disso, apresentam, frequentemente, partos duplos, e excelente capacidade leiteira (OLIVEIRA, 2001).

A exploração de ovinos deslançados na região Nordeste é realizada, desde criadores de subsistência até criadores de animais de alta genética, sendo considerada a maior fonte de proteína e uma grande fonte de renda para a população local, o que demonstra a importância desses animais para a região.

2.2. Fisiologia da reprodução de fêmeas ovinas

A atividade reprodutiva é a manifestação fisiológica de um conjunto de mecanismos e fenômenos complexos que obedecem ao controle endógeno de um sistema hierarquizado de órgãos que se inter-relacionam, utilizando uma linguagem bioquímica (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2008).

As fêmeas ovinas são poliéstricas estacionais de dias curtos. Sendo que a expressão dos fenômenos reprodutivos é influenciada pelo fotoperíodo negativo, ocorrendo, portanto, a intensificação da atividade reprodutiva no outono, quando os dias são mais curtos (FONSECA, 2005). À medida que se aproxima da linha do equador, a ovelha é capaz de ciclar durante todo o ano, desde que esteja em boas condições zootécnicas. Sendo assim, a nutrição, por sua vez, compreende um importante fator para modular a resposta reprodutiva de ovelhas (SALLES, SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000).

O ciclo estral é a funcionalidade ativa dos órgãos reprodutivos femininos que se estabelece após o advento da puberdade. Compreendem modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos genitais e igualmente no perfil dos hormônios relacionados (ANTONIOLLI, 2002).

O ciclo estral da ovelha compreende o intervalo entre dois estros, onde ocorrem profundas transformações tanto em nível hormonal e anatômico quanto no comportamento da fêmea.

A duração deste período, em ovelhas, perdura por $17,0 \pm 2,0$ dias, podendo ser dividido em duas fases distintas: fase folicular e luteal. A fase folicular é caracterizada pelo desenvolvimento do folículo (estrutura no ovário que contém o oócito) e culmina com a ovulação. Nesta fase, encontram-se presentes o proestro e estro. A fase luteal, por sua vez, é caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo (CL), que é formado após a ruptura do folículo e liberação do oócito. É produzida a progesterona (P_4), que é o hormônio responsável pela manutenção da gestação. Nesta fase, encontram-se incluídos o metaestro e diestro (HAFEZ et al., 2004).

A síntese e secreção de P_4 , durante esta fase, inibe a pulsatilidade de GnRH e, conseqüentemente, regula o pico de LH, o crescimento folicular e inibe a secreção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) nos primeiros dias desta fase. Porém, ao seu final, as concentrações de P_4 caem, o que é induzido pelo aumento da secreção de $PGF_{2\alpha}$. Isto leva à regressão do corpo lúteo e à elevação nos níveis de estradiol, induzida pela pulsatilidade do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) e de LH. Em contrapartida, o FSH declina por ação da inibina e estradiol, oriundos do folículo pré-ovulatório (RUBIANES, 2000). Aproximadamente um dia após o pico de LH e a conseqüente ovulação, ocorre um aumento de FSH e também de estradiol proveniente de um novo “pool” de folículos. A ovulação na ovelha ocorre espontaneamente, próximo ao fim do estro, sendo que, no seu decorrer, podem acontecer mais de uma ovulação.

Os oócitos podem ser fecundados de 10 a 25 horas após a ovulação, enquanto os embriões recém-formados adentram o útero a partir do quinto dia, também tomando como referencial a ovulação. A ovelha possui gestação com duração média de 150 dias, sendo que, por ser placenta dependente, a partir do 50° ao 70° dia, a placenta passa a ser fonte primária de P_4 . Outra fase reprodutiva importante na ovelha é o puerpério, no qual ocorre involução uterina, sinal este que se completa, 27 dias após o parto (JAINUDEEN et al., 2004).

O complexo fenômeno da dinâmica folicular ovariana em ovelhas também merece destaque. Segundo Evans et al. (2000), o crescimento folicular na ovelha, se dá em padrão de ondas, tanto na estação de monta quanto no anestro. Para tanto, é

necessário que ocorra uma interação entre os esteróides ovarianos e as gonadotrofinas responsáveis pela dinâmica folicular, sendo que a emergência de cada onda dura de 4 a 6 dias (RUBIANES, 2000).

De acordo com Rubianes e Menchaca (2003), as ondas foliculares possuem, no mínimo, um folículo com diâmetro ≥ 5 mm, por onda; o crescimento do maior folículo se dá de 5-7 dias, com crescimento diário de 1 mm. À medida que a fase luteal avança, as concentrações de P_4 elevam-se, promovendo assim, a emergência de novos folículos. Na maioria dos ciclos com duas ovulações, os folículos são oriundos da mesma onda ovulatória. Contudo, segundo Barrett et al. (2004), existem casos nos quais estes folículos originaram-se de ondas distintas.

2.3. Produção *in vivo* de embriões

A produção *in vivo* de embriões consiste em promover uma estimulação hormonal ovariana, para induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente.

O emprego desta biotécnica é capaz de promover uma rápida expansão genética em núcleos de fêmeas pré-selecionadas e, conseqüentemente, um aumento na intensidade de seleção das mesmas; transportar material genético com reduzido risco de transmissão de doenças; realizar estudos sobre a interação materno-fetal; permitir a conservação de raças em perigo de extinção.

Porém, para o sucesso da mesma, deve-se levar em consideração alguns aspectos, a exemplo do estado nutricional e fisiológico da doadora, qualidade dos hormônios e adequação dos protocolos hormonais a serem utilizados e qualidade do sêmen.

Para a realização desta biotécnica, três etapas são fundamentais: sincronização do estro e superovulação; fecundação das doadoras; e colheita de embriões.

2.3.1. Sincronização do estro e da ovulação

Para que todas as fêmeas entrem em estro e ovulem no mesmo momento, faz-se necessária a sincronização do estro e da ovulação e posterior fecundação, seja por monta natural ou inseminação artificial, a qual constitui uma importante ferramenta para obter o maior número possível de embriões, com o mesmo estágio de desenvolvimento, em todas as ovelhas que passaram pelo tratamento, bem como

para equiparar cronologicamente os estados fisiológicos de receptoras e doadoras (BARIL, BREBIÓN e CHESNÉ, 1995).

A sincronização do estro também é responsável por diminuir o anestro pós-parto, acelerar a seleção de animais geneticamente superiores, diminuir o intervalo entre gerações e concentrar as parições no momento mais desejável para o produtor, sendo de fundamental importância para um bom programa de manejo reprodutivo em ovinos (PAULA, 2008).

Nos ovinos, o desenvolvimento folicular ocorre em um padrão contínuo de ondas, onde aquela mais proeminente ocorre durante o estro, pois, nessa fase do ciclo estral, há o aumento na concentração de FSH, estimulando o surgimento de um crescimento sincrônico de pequenos folículos. Dependendo de fatores intrínsecos ou extrínsecos, um ou mais folículos com diâmetro acima de 5 mm, adquire dominância, ovulando pouco depois. Os folículos menores (subordinados) entram em processo de atresia, podendo ser capazes de responder a estímulos de gonadotrofina exógena e retomar o crescimento (AMIRIDIS e CSEH, 2012).

O protocolo de sincronização mais comumente utilizado em ovinos é baseado no tratamento com progestágeno ou progesterona na forma de dispositivos intravaginais (esponja e CIDR) (ABECIA, FORCADA, GONZÁLES-BULNES, 2012). As esponjas vaginais de liberação lenta, impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), são muito utilizadas. O CIDR[®], que contém 0,33 g de progesterona natural, tem custo mais elevado, mas apresenta também maior eficiência (CASTILHO et al., 2013).

Existem diferentes protocolos hormonais, dentre eles o de curto prazo, que, segundo Vilariño et al., (2013), tem sido desenvolvido para controlar o desenvolvimento folicular e ovariano e a função lútea em ovinos. Este tratamento reduz a exposição ao progestágeno de 14 dias para 5-7 dias, reduzindo a possibilidade de folículos persistentes, embora protocolos de 14 dias estabeleçam maior sincronia da ovulação.

O protocolo a ser utilizado deve levar em consideração a fase em que o animal se encontra. Segundo Castilho et al. (2013), para realizar a sincronização do estro durante o anestro estacional, é necessário que o progestágeno seja acompanhado de eCG, o qual atua induzindo o desenvolvimento de folículos durante os períodos de inatividade hipotalâmica – hipofisária.

A sincronização do estro também pode ser realizada apenas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou associada a progestágenos ou progesterona. O uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$ leva à sincronização do estro através da luteólise e esse hormônio ou seus análogos sintéticos vêm sendo administrados em um programa de duas injeções intramusculares, intervaladas por 11 dias, em fêmeas que estejam ciclando (DELIGIANNIS et al., 2005).

No que consiste em aumentar a resposta ovariana, a eCG atua no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, regulando mecanismos intra ovarianos e, por possuir uma meia-vida longa e mimetizar os efeitos dos hormônios FSH e LH, é, geralmente, o hormônio de eleição para induzir a ovulação. Apenas uma aplicação de eCG, após tratamento com progestágenos, eleva a resposta ovariana, a taxa de concepção e o percentual de nascimentos múltiplos (BARRETT et al., 2004). Contudo, seu uso prolongado desencadeia respostas fisiológicas indesejáveis, dentre as quais se destacam a resposta imunológica anti-eCG, a dificuldade de locomoção dos espermatozoides no trato genital feminino e a formação de cistos ovarianos (MARTEMUCCI e D'ALESSANDRO, 2010).

Na tentativa de evitar os efeitos adversos da eCG, as pesquisas atuais introduzem, cada vez mais, protocolos que utilizam o GnRH para a realização da sincronização, o qual, de acordo com Cunningham (2008), é responsável por desencadear a liberação do FSH e LH, os quais são indispensáveis para que ocorra a maturação oocitária e ovulação. Segundo Martemucci e D'Alessandro (2010), protocolos com GnRH estão conferindo bons resultados de prolificidade após estro induzido, algo em torno de 175%. E, em associação ao GnRH, se pode-se utilizar o efeito macho, que consiste em deixar o reprodutor fora do rebanho por um período de 20 dias e, ao reintroduzi-lo, as fêmeas começam apresentar estro. Porém, o efeito macho é considerado uma ferramenta auxiliar para maximizar os resultados do GnRH, já que, para Fonseca (2005), este sozinho pode ou não homogeneizar o aparecimento do estro e ovulação.

2.3.2. Tratamentos hormonais de superovulação

O tratamento superovulatório é um caminho viável para otimizar a produção *in vivo* de embriões em fêmeas que tem alto valor genético ou de uma raça ameaçada ou que estejam no final de suas vidas reprodutivas.

Os hormônios que são empregados nos protocolos de superovulação, quando em razão da aplicação de gonadotrofinas exógenas, agem através de três mecanismos: (1) quando um determinado número de folículos está em estágio inicial de atresia, estes são "resgatados", em razão da estimulação hormonal que tende a induzir a reativação dos mecanismos normais, culminando na esteroidogênese normal e também em elevado índice de mitose; (2) pequenos folículos, às vezes de classificações morfológicas e funcionais distintas, poderiam ser estimulados em conjunto, num ritmo de desenvolvimento superior ao normal, passando a atingir, concomitantemente, um mesmo estágio de desenvolvimento num menor espaço de tempo; (3) O processo de atresia folicular seria reduzido (FERNANDES, 2003).

A variabilidade imprevisível na resposta superovulatória é uma das etapas mais críticas em programas de produção de embriões ovinos. Isto ocorre em razão de fatores endógenos, a exemplo da genética, estado nutricional e estado folicular; e exógenos, como tratamento de superovulação, o tipo de gonadotrofina e estação do ano (AMIRIDIS e CSEH, 2012).

As gonadotrofinas que têm sido usadas para superovulação incluem gonadotrofina menopáusic humana (hMG), eCG e FSH, sendo este último de origens suína ou ovina. A hMG tem sido pouco utilizada, devido a sua desvantagem de induzir regressão lútea prematura.

Quanto à eCG, o principal problema do seu uso, se dá após seu uso repetido, o que promove uma resposta humoral a esta gonadotrofina e conseqüente indução da produção de anticorpos anti-eCG, o que pode afetar a fertilidade (FORCADA et al., 2011). Essa gonadotrofina tem sido utilizada para superovulação em ovelhas, sozinha ou em combinação com FSH. Estudo anterior demonstrou que a resposta superovulatória, utilizando eCG, é menor em comparação com a FSH, enquanto o tempo de ovulação não está bem sincronizado (AMIRIDIS e CSEH, 2012).

O FSH pode ser 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, geralmente em doses de 240 a 250 UI quando a via de administração é intramuscular. Segundo Loiola Filho (2013), essa dose pode ser reduzida para 128 UI, a fim de evitar o hiperestrogenismo e reduzir custos. O FSH tem mostrado superioridade à eCG em termos de taxas de ovulação e fecundação e na produção de embriões de boa qualidade.

Alguns fatores contribuem para a redução das recuperações embrionárias após superovulação, como a regressão lútea precoce antes da época normal para a colheita embrionária, que pode ser decorrente do uso de análogos sintéticos de prostaglandinas, elevando a concentração de LH e estradiol. Além disso, a população folicular presente no ovário no momento do início do tratamento com FSH tem grande influência na resposta ao protocolo. Com a utilização dos protocolos convencionais, a população folicular existente no início do tratamento com gonadotrofina é desconhecida. Por esta razão, o resultado para um mesmo tratamento pode variar de 0 a 30 embriões transferíveis (VARAGO, MENDONÇA e LAGARES, 2008).

A elevada variabilidade na resposta superovulatória, notada, principalmente, em ovelhas, tende a prejudicar o processo de fecundação (HAWK, COOPER e CONLEY, 1987). Diante dos diversos tratamentos superovulatórios, a falha na fecundação ocorre, particularmente, em ovelhas que mostram uma elevada resposta ovulatória. Isto está vinculado com os elevados níveis de estradiol produzidos pelos folículos, que, conseqüentemente, dificultam a locomoção dos espermatozoides no trato genital feminino, diminuindo, significativamente, as taxas de fertilidade (MARTEMUCCI e D'ALESSANDRO, 2010).

2.3.3. Métodos de fecundação das doadoras de embriões

A monta natural e a inseminação artificial são técnicas que têm sido empregadas para a obtenção da fecundação das fêmeas. Contudo, torna-se necessária a utilização de machos de fertilidade comprovada.

Na monta natural, machos e fêmeas tendem a ficar juntos, na proporção de um macho para três a quatro fêmeas (BARIL, BREBIÓN e CHESNÉ, 1995), devendo os machos selecionados apresentarem tanto condições físicas quanto aptidão sexual satisfatórias, para alcançar o número desejado de montas. Essa técnica torna-se limitada, uma vez que os melhores reprodutores estão concentrados nos grandes centros de inseminação artificial. Segundo Murray et al. (1994), na técnica de monta controlada, os machos ficam com as fêmeas em períodos determinados de cobertura, pelo menos, duas vezes durante o período de estro, com intervalo de 12 horas. As montas, consideradas mais eficazes, são aquelas realizadas em intervalos entre 12 e 24 horas após o início do estro.

A IA é uma biotécnica largamente difundida, sendo caracterizada como um método eficaz, uma vez que permite disseminar num reduzido espaço de tempo, o material genético do macho, uma vez que um único ejaculado pode vir a resultar na fecundação de várias fêmeas. Nesta técnica, características singulares são estimadas como: a aptidão do macho para ejacular em vagina artificial e a qualidade do sêmen produzido. Além disso, a técnica ainda permite aproveitar o material genético de animais que já não são capazes de acasalar, como em casos em que estes sejam portadores de patologias que impeçam a monta, ou até em casos de morte de reprodutores de elevado potencial genético, onde seu sêmen, possivelmente, será colhido e armazenado para uma futura aplicação.

Durante o processo de fecundação, ocorrem falhas que são, na maioria das vezes, mais evidentes em ovelhas, sendo estas, naturalmente ou artificialmente, inseminadas, como resultado do processo de transporte espermático através da cérvix. Este problema pode ser contornado com a deposição de sêmen no lúmen uterino através de métodos cirúrgicos (TROUSON e MOORE, 1974) ou por inseminação laparoscópica em ovelhas superovuladas (EHLINGH et al., 2003).

2.3.4. Métodos de colheita de embriões

A colheita embrionária consiste em submeter a luz uterina ou tubária a um processo de lavagem, objetivando a recuperação dos embriões produzidos, podendo ser alcançada, quer seja pelo método Cirúrgico (Laparotomia), Semi-cirúrgico (Laparoscopia) ou, ainda, Não Cirúrgico (Transcervical) (SELVARAJU et al., 2003).

A colheita Transcervical, largamente utilizada e com êxito em vacas, é uma opção para os métodos Cirúrgico e Semi-cirúrgico utilizados em ovelhas. Para tanto, a cérvix é tracionada com o auxílio de pinças de Allys e, com um cateter de três vias, ultrapassa-se a cérvix, chegando ao útero, quando, através de uma das vias, é injetado ar para inflar o balão do cateter de três vias no lúmen de cada corno uterino, obstruindo o mesmo. Então, por outra via, ocorre a injeção de Solução Salina Fosfato-Tamponada (PBS), carreando os embriões para a terceira via, a qual desembocará num tubo plástico, recuperando meio PBS e, possivelmente, embriões. Porém, um dos problemas que restringe o uso desta técnica na ovelha é a disposição irregular dos anéis cervicais, encurtando a passagem do cateter. Visando solucionar este problema, vêm sendo testadas aplicações prévias de fármacos que promovam a dilatação cervical, horas antes da colheita (PEREIRA, SOHNREY e

HOLTZ, 1998). As taxas de recuperação obtidas pelo método Cirúrgico ainda são superiores, variando de 70% a 90% (FORCADA et al., 2011), quando comparadas às taxas conseguidas pelo método Transcervical em caprinos, que giram em torno de 60% (LIMA-VERDE et al., 2003).

No tocante à colheita de embriões por Laparoscopia, esta é feita em maca de imobilização específica. Logo após, é estabelecido um pneumoperitônio para início do procedimento de colheita, para o qual são efetuadas três punções abdominais, sendo uma para o endoscópio, outra para uma sonda de três vias e uma última para a pinça de manipulação. Contudo, a exposição do animal a riscos de aderências, o alto custo do aparelho de Laparoscopia e a necessidade de uma equipe especializada são limitações que restringem a utilização desta técnica (FREITAS e SIMPLÍCIO, 2001).

A técnica de Laparotomia é considerada a mais empregada e mais eficaz em pequenos ruminantes (SELVARAJU et al., 2003). Neste método, os embriões podem ser colhidos com êxito tanto da tuba uterina quanto do útero. Para tanto, as fêmeas doadoras de embriões devem ser, anteriormente, submetidas a jejum hídrico e alimentar, por 12 e 24 horas, respectivamente, para, em seguida, serem submetidas aos procedimentos de anestesia geral. As fêmeas são sedadas com cloridrato de xilazina (0,11 mg/kg PV) e ketamina (5,5 mg/kg PV), dez minutos depois, sendo ambas as aplicações por via intramuscular. Deve-se realizar uma aplicação local e subcutânea de cloridrato de lidocaína (0,1 g/animal) na linha alba, onde será realizada uma incisão de 15 a 20 cm de comprimento, cranialmente à base do úbere (ISHWAR e MEMON, 1996). O processo de exteriorização dos cornos uterinos, tubas uterinas e dos ovários deve ser realizado com a fêmea em decúbito dorsal, em maca apropriada, com inclinação ântero-posterior de 30° a 45°. Uma vez exteriorizados os ovários, é feita a contagem dos corpos lúteos, tornando possível avaliar a eficácia do tratamento superovulatório através da contagem de corpos lúteos, e do método cirúrgico de colheita de embriões através da obtenção da taxa de recuperação embrionária. A lavagem para recuperação embrionária é realizada com PBS, a 37°C. A colheita tubária deve ser realizada dois a quatro dias após o início do estro (BARIL, BREBIÓN e CHESNÉ, 1995), sendo as tubas uterinas cateterizadas através do infundíbulo com um cateter plástico. Em seguida, após a inserção de uma agulha 25 g acoplada a uma seringa de 20 mL na junção

útero-tubárica, o meio de lavagem é injetado em direção ao infundíbulo (ISHWAR e MEMON, 1996).

A colheita uterina deve ser realizada cinco a seis dias após o início do estro. Para tanto, uma punção na base do corno uterino é realizada para introduzir um cateter de colheita na luz uterina, a qual deve ser obstruída através de compressão digital ou pelo uso de pinça atraumática. Então, uma seringa de 50 mL, acoplada a uma agulha de 18 g é inserida na luz uterina, próximo à junção útero-tubárica e 30 mL a 40 mL de meio de lavagem a 37°C são injetados no interior de cada corno uterino e recuperado por outra via do cateter de Foley. Os lavados são vertidos em placas de Petri, plásticas, para avaliação imediata e contagem em estereomicroscópio em um aumento de 40 a 70 vezes.

A colheita cirúrgica é o método de recuperação utilizado em pequenos ruminantes, mais eficiente quanto às taxas de recuperação, mostrando-se superior aos demais, variando de 70% a 90% (FORCADA et al., 2011). Contudo, essa técnica, quando realizada continuamente na mesma fêmea doadora, influencia, negativamente sobre a taxa de recuperação embrionária. Todavia, podem-se reduzir esses efeitos através da aspensão do útero e dos ovários com soro fisiológico heparinizado (50 UI de heparina sódica/mL) ou com solução de Dextran 70 g a 6,0%. A sutura pode ser feita com um padrão simples interrompido com fio de poliglactina 2-0 (ISHWAR e MEMON, 1996).

2.3.5. Avaliação e classificação dos embriões

Os embriões são avaliados quanto às suas características morfológicas e, a partir disso, é possível determinar o seu estágio de desenvolvimento. Essa classificação leva em consideração a presença e a intensidade de imperfeições, tais como presença de blastômeros de tamanhos irregulares, em extrusão, morte ou fragmentação, alterações de cor ou tamanho da massa celular, ausência de compactação e danos na zona pelúcida. A avaliação dos embriões é feita em função do percentual da massa celular intacta, livre de alterações.

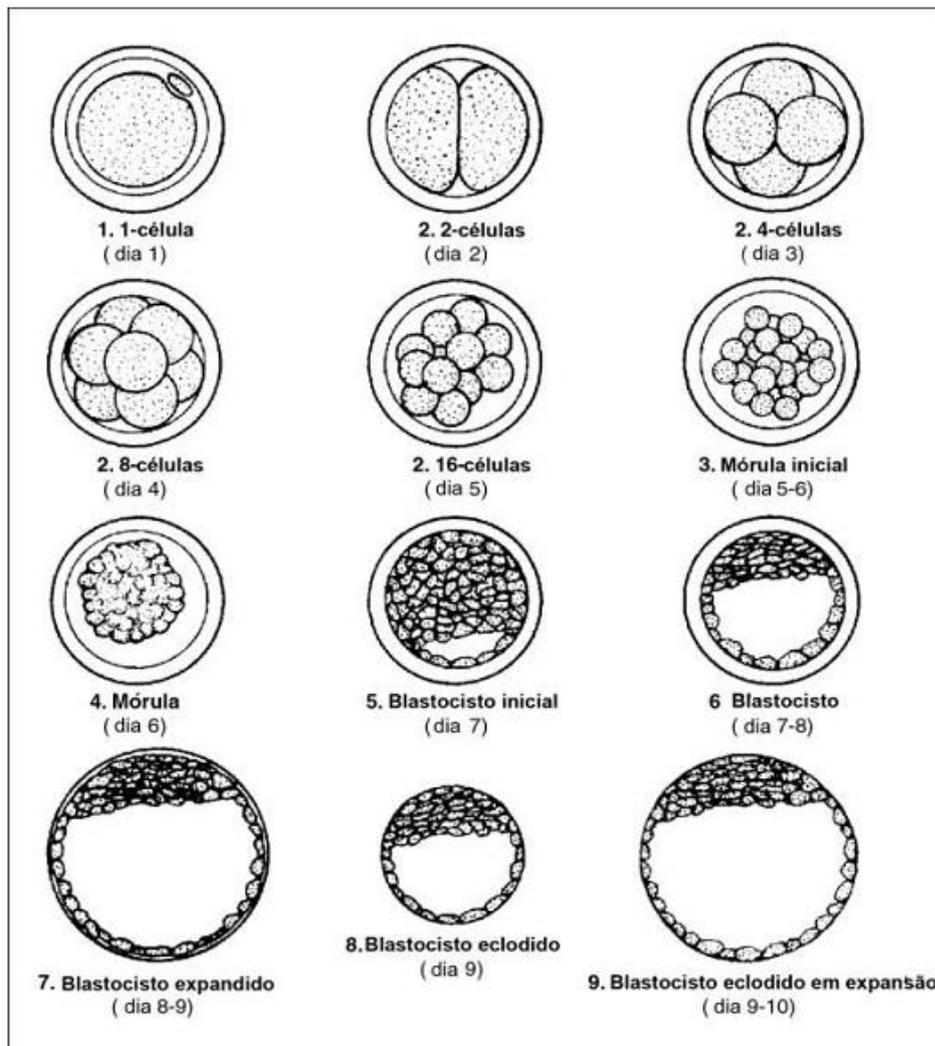
A classificação mundialmente utilizada foi proposta pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a qual dividiu, morfológicamente, em nove categorias (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1 – Estádios embrionários e suas respectivas características morfológicas (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).

Estádio	Características
Embrionário	
1 célula	Zigoto recém-formado, com apenas uma célula circundada pela zona pelúcida e apresentando o 2º. corpúsculo polar no espaço perivitelínico (EPV).
2-16 células	Estádio onde ocorrem as clivagens iniciais, sendo possível contabilizar o número de blastômeros.
Mórula inicial (Mi)	Massa de células com separação nítida entre os blastômeros ocupando quase a totalidade do EPV.
Mórula compacta (Mc)	Blastômeros agregados entre si formando uma massa compacta, ocupando 60% a 70% do EPV.
Blastocisto inicial (Bi)	Início da formação da blastocele e diferenciação entre o trofoblasto e o botão embrionário; o embrião ocupando 70% a 80% do EPV.
Blastocisto (B1)	Evidente diferenciação entre as células do trofoblasto e do botão embrionário; as células do botão embrionário estão compactadas, a blastocele é predominante.
Blastocisto expandido (Bx)	O embrião aumenta 1,2 a 1,5 vezes o seu diâmetro e a zona pelúcida diminui em 1/3 a sua espessura; é evidente a pressão do líquido da blastocele, que empurra o trofoblasto contra a zona pelúcida.
Blastocisto em eclosão (Bn)	O embrião está iniciando o processo de saída da zona pelúcida.

Blastocisto eclodido (Be)	O embrião está completamente livre da zona pelúcida; ainda é nítida a presença da blastocele.
---------------------------	---

Figura 2. Códigos numéricos de estágio de desenvolvimento embrionário. 1 = embrião não fecundado ou embrião de 1 célula; 2 = embriões com 2 a 16 células; 3 = mórula inicial; 4 = mórula compacta; 5 = blastocisto inicial; 6 = blastocisto; 7 = blastocisto expandido; 8 = blastocisto em eclosão; blastocisto eclodido; 9 = blastocisto eclodido em expansão (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).



De acordo com Oliveira (2009), o estágio do desenvolvimento embrionário é de fundamental importância para a classificação dos embriões, pois está diretamente

relacionado com sua posterior sobrevivência. Relata também que as taxas de sobrevivência embrionária de mórulas é menor que a de blastocistos (Tabela 2).

Tabela 2 – Sobrevivência embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Adaptado de Oliveira, 2009).

Estádio embrionário	Sobrevivência embrionária (%)
Mórula	15/59* (25,4) ^b
Blastocisto inicial	0/3* (0,0) ^c
Blastocisto	10/22* (45,5) ^a
Blastocisto expandido	3/6* (50,0) ^a
Total	28/90* (31,1)

Nº de crias / *Nº de embriões transferidos

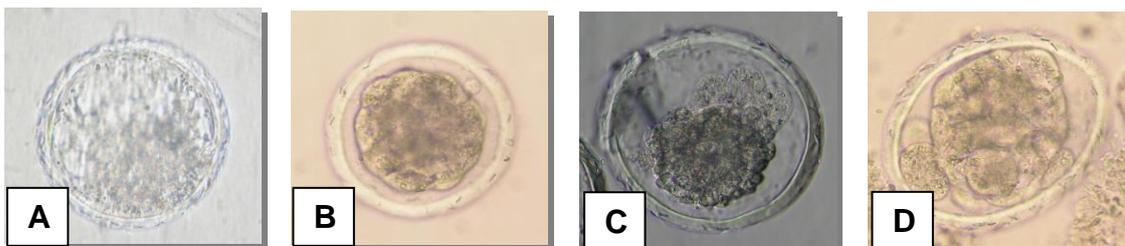
Os embriões ainda são avaliados quanto às características morfológicas individualizadas, como: padrão de cor, tamanho, forma, integridade da zona pelúcida, homogeneidade do citoplasma e presença de células no espaço perivitelínico, sendo esses caracteres responsáveis pela definição quanto a sua qualidade (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3 – Qualidade embrionária e suas respectivas características (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).

Qualidade embrionária	Características
Grau 1: Excelente ou Bom	Massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros (células) individuais, que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Irregularidades devem ser relativamente menores e ao menos 85% do material celular devem ser de massa embrionária viável intacta. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas.
Grau 2: Regular	Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular devem compor

	uma massa embrionária viável, intacta.
Grau 3: Pobre	Irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular devem formar uma massa embrionária viável, intacta.
Grau 4: Morto ou degenerado	Embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.

Figura 3 – Graus de qualidade embrionária: (A) Grau 1 – Excelente; (B) Grau 2 – Regular; (C) Grau 3 – Pobre 3; (D) Grau 4 – morto ou degenerado (Fonte: Arquivo Pessoal).



Bari et al. (2003) relataram que embriões de Graus 3 e 4 toleram melhor a assincronia do estro entre doadora e receptora, do que os embriões de Graus 1 e 2, e que as mórulas iniciais toleram melhor esta assincronia do que embriões em outros estádios. Os autores relatam também que não houve diferença na taxa de sobrevivência entre embriões de Graus 1 e 2 (75,6% e 73,8%, respectivamente). Entretanto, conforme a qualidade do embrião declinou, as diferenças se tornaram mais notáveis. Os embriões de Grau 3 tiveram uma menor taxa de sobrevivência (61,4%), comparado aos embriões de Graus 1 e 2, com uma redução mais notável na taxa de sobrevivência dos embriões de Grau 4 (37,5%), embora deva-se notar que o número de embriões de Grau 4 transferidos foi, relativamente, menor. Ainda segundo eles, devido ao fato de todos os embriões terem sido transferidos para receptoras com perfil semelhante de sincronização de estro com as ovelhas doadoras, a melhor taxa de sobrevivência dos embriões de alto grau deve ser devida a sua melhor habilidade em ajustar ou alterar o ambiente uterino ao seu favor.

Oliveira (2009) observou que os embriões de Grau 1 obtiveram melhores percentuais de sobrevivência quando comparados aos de Grau 2, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Sobrevivência embrionária de acordo com a qualidade dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Adaptado de Oliveira, 2009).

Qualidade embrionária	Sobrevivência embrionária(%)
Grau 1	18/59* (30,5) ^a
Grau 2	9/31* (29,0) ^b
Total	28/90* (31,1)

Nº de crias / *Nº de embriões transferidos

Ainda com relação à morfologia embrionária, Monte (2013) propôs uma classificação para melhor determinar os graus de qualidade, estabelecendo as categorias: Proporção de extrusão embrionária (Baixa – 0 a 5%, Média – 6 a 15% e Alta - >15%); Proporção de cada nível de homogeneidade da massa embrionária (Homogênea, Levemente Heterogênea e Heterogênea); Percentual de embriões com cada grau de retração (Sem retração; Levemente retraída; Com retração). Nesse mesmo trabalho, avaliando embriões antes e após o congelamento/descongelamento a autora afirmou que parâmetros, tais como extrusão e homogeneidade da massa celular interna podem afetar a posterior qualidade e, conseqüentemente, sobrevivência embrionária, mas isso pode variar de acordo com o tratamento que é dado à célula, a exemplo da adição e remoção de crioprotetores.

2.3.6. Fatores que influenciam a produção in vivo de embriões

São vários os fatores capazes de promover a morte embrionária, necessitando, ainda, ser melhor caracterizados. Esses fatores podem estar vinculados ao próprio embrião ou ao ambiente uterino.

Estima-se que a principal causa seja decorrente de problemas de sinalização entre o concepto e a mãe, o que pode proporcionar um desenvolvimento

assincrônico ou um retardo no crescimento embrionário, bem como a falha na produção de Interferon T (SPENCER et al., 2004). Outro fator que pode estar vinculado à morte embrionária é a síntese inadequada de hormônios e fatores de crescimento oriundos do embrião (RILEY e MOLEY, 2006).

Com relação às perdas embrionárias que possuem como origem, fatores intrínsecos ao ambiente uterino e outras situações ligadas à mãe, observa-se inúmeras causas. Dentre elas, o estado sanitário, conforto térmico, manejo e nutrição adequada. Em meio a estes fatores, possui maior relevância, 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 (McEVOY et al., 2001).

Principalmente na fase que antecede a 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 sobre 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, acima do porte padrão para a raça. 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 fornecido às matrizes. Estes precisam atender as exigências das matrizes para não afetar a produção de embriões, pois, a depender da quantidade de alimento, haverá um maior ou menor fornecimento de componentes. Ashworth (1995) em experimento utilizando ovelhas superalimentadas durante o início da gestação, relatou um decréscimo na proporção de embriões produzidos, o que complementa os achados por Williams e Cumming (1982 apud Squires, 1993. p. 308). Imagina-se que esta redução resulte do aumento do metabolismo da P₄ pelo fígado. Assim, a

progesterona plasmática será metabolizada quase que totalmente em uma única passagem pelo fígado, provocando o declínio de suas concentrações periféricas, assim, a prenhez pode ser interrompida, porque em resposta a baixa concentração de P_4 , os níveis de $PGF_{2\alpha}$ aumentam, promovendo contração uterina (ASHWORTH, 1995).

Em contradição, Dunne et al. (1997) comprovaram que a diminuição da alimentação, por um curto período de tempo, aumentaram a taxa de gestação em bovinos.

Yaakub et al. (1996), trabalhando com novilhas de corte, relataram que restrições alimentares melhoraram a taxa de desenvolvimento embrionário, aumentando o número de blastocistos e o número de células totais dos blastocistos, o que demonstra a evolução no seu desenvolvimento.

O semiárido nordestino, especialmente a microrregião do Submédio São Francisco, apresenta sérios problemas no âmbito alimentar, pois há escassez de alimento por longos períodos do ano. Devido às condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento vegetal, as plantas perdem suas folhas e têm seu valor nutricional reduzido. Sendo assim, solucionar esses entraves para maximizar os resultados, bem como diminuir custos são desafios a serem alcançados. Neste contexto, o produtor necessita de uma alternativa para suplementar seus animais na época seca, já que esta compreende um lapso muito grande, sendo suficiente para interferir negativamente em todo o sistema reprodutivo das fêmeas criadas nesta região.

Assim, sabendo desta escassez de alimento, a expansão da fruticultura no semiárido nordestino desponta como uma importante saída para a pecuária desta região, já que é caracterizada pela produção de toneladas de resíduos de abacaxi, melão, manga, acerola e uva, no decorrer de todo ano (CQBAL, 2012).

No que diz respeito à uva, dentre as fruteiras cultivadas comercialmente no Submédio São Francisco, aparece como a terceira mais importante cultura local em termos de área plantada e atinge uma produção anual de 240.000 t (VALEEXPORT, 2002). Entre desbrotas, despontas, raleio e desbastes dos cachos, além do manuseio inadequado, as perdas do fruto, no que diz respeito ao consumo humano, podem variar de 20 a 95% (CHOUDHURY e COSTA, 2004).

Esse resíduo surge então, como uma fonte potencial para a alimentação animal, devido a sua grande disponibilidade. Além disso, autores como Rotava

(2007), afirmam que o subproduto da uva é capaz de fornecer níveis protéicos razoavelmente elevados, em torno de 12,8% de proteína bruta no bagaço e 10,3% na semente; que apresentam, ainda, na composição da sua semente, altos níveis de ácidos oléico (19,07%) e linoleico (67,73%), os quais são elementos essenciais para pequenos ruminantes; além de apresentar altos teores de Tanino, considerado um antioxidante, sendo capaz, então, de aumentar o tempo de vida dos espermatozoides no trato feminino e proteger os óocitos e embriões de danos oxidativos à nível de membrana e núcleo celulares (PASA, 2010).

Maggioni et al. (2008) afirmaram, ainda, que o fornecimento de alimento com moderado teor de tanino consensado é capaz de promover ganho de peso, aumento do escore de condição corporal e, principalmente, a redução de perdas embrionárias, já que o tanino induz a diminuição da catálise de proteínas da qual resultariam metabólitos tóxicos como uréia e amônia, que são responsáveis por alterar o gradiente de pH que existe entre as células apicais e basais da parede uterina, o qual é regulado pela P_4 . Na presença desses metabólitos, a progesterona torna-se incapaz de manter o meio, levando a um aumento de $PGF_{2\alpha}$, a qual afeta, negativamente, o desenvolvimento embrionário, assim como sua sobrevivência.

Porém, quando utilizado, o subproduto da uva tem sido fornecido de maneira empírica, sem avaliar os possíveis efeitos positivos e, principalmente, negativos da sua utilização.

Sendo assim, este trabalho se propôs a estabelecer uma dieta estratégica, a partir de alimento alternativo, a fim de reduzir as perdas reprodutivas em períodos de escassez de alimento, reduzindo, conseqüentemente, os custos de produção na ovinocultura local e sugerir uma alternativa à eliminação e/ou ao estoque inadequado do resíduo de uva.

3. JUSTIFICATIVA

As biotecnologias da reprodução têm sido amplamente aplicadas em ovinos na região Nordeste do Brasil, na tentativa de melhorar quantitativa e qualitativamente a produção desses animais, cuja criação é considerada fonte de renda de muitas famílias. Dentre as biotécnicas utilizadas, cita-se a produção *in vivo* de embriões, que se baseia na superovulação de fêmeas geneticamente superiores, para que se obtenha uma maior quantidade de embriões produzidos, os quais serão transferidos às receptoras, que darão continuidade à gestação. Esta biotécnica tem ganhado espaço na região Nordeste, por ser a forma mais eficaz para acelerar o melhoramento genético e explorar ao máximo o potencial de matrizes e reprodutores.

Apesar disso, a produção *in vivo* de embriões se depara com alguns fatores que são capazes de reduzir a sua eficiência. Na região Nordeste, os principais entraves estão relacionados à nutrição, devido à escassez de chuvas que gera uma inconstância na quantidade e na qualidade dos alimentos que são fornecidos, principalmente, às doadoras de embriões, as quais apresentam uma alta exigência proteica e energética, para que a produção de embriões seja satisfatória, tanto com relação a sua quantidade quanto à qualidade.

Devido a isso, alguns produtores têm lançado mão da utilização de alternativas alimentares, como é o caso dos resíduos de fruta, encontrados abundantemente em algumas microrregiões, como é o caso do Submédio São Francisco, onde a fruticultura irrigada, principalmente o cultivo de uva, mantém sua produtividade constante durante todo o ano, gerando também, uma grande quantidade de resíduo, que é superior à demanda pelos mesmos. Isso acaba promovendo poluição do solo, do ar e das águas. Há relatos de que o resíduo da uva tem sido utilizado na alimentação de ovinos, porém de forma indiscriminada, sem levar em consideração possíveis efeitos negativos ou, quem sabe, positivos tanto produtiva quanto reprodutivamente.

Tomando como base a importância da reprodução para manter a produtividade do rebanho, faz-se necessário conhecer os reais efeitos dessa suplementação sobre parâmetros reprodutivos das ovelhas, bem como o nível seguro de inclusão desse resíduo na alimentação desses animais, a fim de garantir um “status” nutricional que assegure a realização da produção *in vivo* de embriões em qualquer período do ano.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo Geral*

- Avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de farinha de resíduo seco de uva (*Vitis vinifera*) sobre a produção *in vivo* de embriões de ovelhas exploradas no semiárido do Submédio São Francisco.

4.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito de diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva no concentrado fornecido a ovelhas deslanadas, sobre:
 - Percentual de doadoras de embriões em estro;
 - Intervalo (h) entre a retirada do CIDR e início do estro;
 - Percentual de ovelhas ovulando;
 - Percentual de doadoras de embriões superovulando;
 - Número de corpos lúteos;
 - Taxa de recuperação embrionária;
 - Taxa de fecundação;
 - Qualidade embrionária;
 - Parâmetros morfológicos embrionários.

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 o protocolo experimental conduzido conforme os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

5.2. *Local de execução*

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), localizada em Petrolina-Pe, a 9° 23' 34" de latitude Sul e 40° 30' 28" de longitude Oeste, numa altitude de 376 m e com temperatura média anual de 26°C. Apresenta ainda, pluviosidade média anual 535,5 mm³, a qual é distribuída no período de fevereiro a abril (EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2009).

5.3. *Animais experimentais*

Foram utilizadas 20 ovelhas deslanadas como doadoras de embriões, que ainda não haviam sido submetidas a tratamentos hormonais, as quais foram submetidas a exame ultrassonográfico para garantir que animais prenhes ou portadores de alguma patologia reprodutiva não fossem utilizados para o experimento. Foram ainda, utilizados três carneiros deslanados com fertilidade comprovada, como reprodutores. Os animais foram submetidos a um regime intensivo de manejo e alojadas individualmente, em baias de 2 m² (2 x 1 m), separadas por tela campestre de 1,20 m de altura, com cocho externo para ração e outro interno para água. As fêmeas eram liberadas das baias individuais apenas para limpeza das mesmas. Foram alimentadas com capim *Pennisetum purpureum* (capim elefante) picado, além de concentrado, que tinha sua composição variada a depender do grupo experimental, e era fornecido a vontade, às 9:00 e às 15:00 horas, sendo que a dieta foi formulada a fim de atender a exigência nutricional para fêmeas ovinas em pré cobertura. Os animais tiveram, ainda, livre acesso à água e uma suplementação mineral para ovinos durante todo o experimento. Os reprodutores permaneceram, durante o dia e a noite, em aprisco coberto recebendo dieta de capim elefante à vontade e uma mistura de alimentos concentrados (80% de farelo de milho, 20% de farelo de soja), na quantidade de 1,5 kg/animal/dia, em

duas refeições, além de água e sal mineral à vontade. O manejo sanitário foi baseado no controle de endo e ectoparasitas de todos os animais, uma semana antes do início dos protocolos experimentais, utilizando-se o produto a base de Ivermectina à 1% (Absolut[®], VALLÉE, Brasil), na dosagem de 1 mL para cada 50 kg de peso, aplicada por via sub cutânea.

5.4. Delineamento experimental e tratamentos alimentares

O delineamento foi inteiramente casualizado. As ovelhas foram distribuídas homogeneamente em quatro grupos, alimentados com uma proporção volumoso:concentrado de 60:40. Os tratamentos alimentares diferiram quanto à composição do concentrado que era composto por 25% de farelo de soja e 75% de farelo de milho, o qual era substituído em diferentes proporções por farinha de resíduo de uva. Os animais do Grupo 1 (Controle) foram alimentados com ração formulada utilizando apenas farelo de milho e farelo de soja (ingredientes já comercialmente utilizados); no Grupo 2 (UVA10), alimentados substituindo 10% da ração concentrada por farinha de resíduo de uva; no Grupo 3 (UVA20), alimentados substituindo 20% da ração concentrada por farinha de resíduo de uva; e no Grupo 4 (UVA30), alimentados substituindo 30% da ração concentrada por farinha de resíduo de uva (Tabela 5).

Tabela 5 – Alimentos utilizados na formulação das rações para cada grupo experimental e suas respectivas proporções.

Alimento	Grupos			
	Controle	UVA 10	UVA 20	UVA 30
Capim elefante (%)	60,0	60,0	60,0	60,0
Resíduo de uva (%)	0,0	10,0	20,0	30,0
Farelo de soja (%)	10,0	7,4	5,0	2,3
Farelo de milho (%)	30,0	22,5	14,8	7,3
Uréia (%)	0,0	0,1	0,2	0,4
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

A ração foi balanceada de modo a suprir as necessidades nutricionais de um animal, no período pré-cobertura e primeiras semanas de gestação (NRC, 2007) e

de modo que apresentassem níveis semelhantes de proteína, energia, fibra e matéria seca, como mostra a Tabela 6, sendo fornecida por 26 dias (20 dias antes e 6 dias depois da cobertura). Todos os animais foram previamente submetidos a um período de 10 dias de adaptação ao tratamento alimentar correspondente ao seu grupo experimental.

Tabela 6 – Composição bromatológica da ração nos diferentes grupos experimentais.

Alimento	Grupos			
	Controle	UVA 10	UVA 20	UVA 30
MS (%)	49,5	49,7	50,0	50,2
MO (%)	93,6	93,0	92,4	91,9
PB (%)	11,5	11,1	10,9	10,8
FDN (%)	54,2	55,7	56,2	57,8
FDA (%)	31,3	32,7	33,2	34,5
EE (%)	2,2	2,2	2,2	2,3
NDT (%)	64,6	62,1	61,6	59,1

NDT = Obtido através da soma da estimativa desse valor para todos os ingredientes. Disponível em: CQBAL 3.0

Além da composição supracitada dos alimentos, foi possível obter 4% de tanino no subproduto da uva.

5.5. Tipo, obtenção e processamento do subproduto da uva

Para a realização do experimento, foi utilizada a uva de mesa (*Vitis vinifera*), da variedade Benitaka. Essa variedade foi originada de mutação somática na variedade Itália.

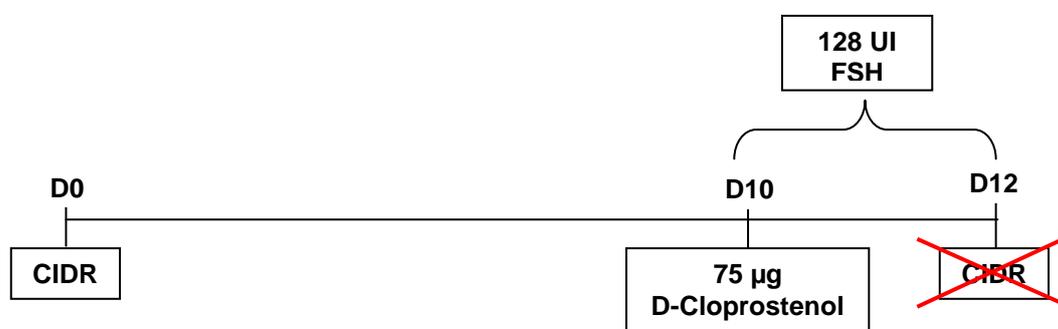
O resíduo era proveniente do Núcleo de Irrigação Senador Nilo Coelho 5 (N5). Após obtenção, o material era prensado para eliminar parte da umidade e facilitar a secagem, a qual era feita ao Sol e em área cimentada, sendo espalhados em camadas de, aproximadamente, 5 cm de espessura e revolvidos a cada três dias, até a secagem, que acontecia em, no máximo, 12 dias, a depender da condição climática. O subproduto era composto por película, semente e engaço.

5.6. Produção *in vivo* de embriões

5.6.1. Tratamentos hormonais

Todas as doadoras de embriões foram submetidas ao mesmo tratamento hormonal. Receberam, por via intravaginal, um dispositivo liberador de progesterona (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), por um período de 12 dias, a partir do décimo dia de tratamento alimentar, contados após o final do período de adaptação. O tratamento superovulatório com pFSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá) foi iniciado, 48 horas antes do final do tratamento com progesterona, quando as doadoras receberam, por via intramuscular, 128 mg de pFSH, divididas em seis doses decrescentes (32/32; 16/16; 16/16 mg), em intervalos de 12 horas. Concomitante com a primeira aplicação de pFSH, também foram administradas, por via intramuscular, 75 µg de um análogo da PGF_{2α} (d-Cloprostenol) (Prolise[®], Tecnopec, Brasil).

Figura 4. Esquema do protocolo hormonal para sincronização de estro e superovulação.



5.6.2. Detecção de estro e fecundação

Após 12 horas da retirada do CIDR, iniciou-se a detecção do estro das doadoras de embriões. Para isto, foram utilizados três carneiros deslanados, os quais ficaram expostos às fêmeas por 30 minutos, a cada quatro horas. As ovelhas foram consideradas em estro, quando se mantiveram imóveis diante da tentativa de monta feita pelo macho (MAULÉON e DAUZIER, 1965). Concomitante à determinação do início do estro, as fêmeas foram submetidas à monta natural, a qual era repetida 24 horas depois da primeira. Os carneiros utilizados para a monta

foram os mesmos utilizados para a detecção de estro, os quais tiveram sua fertilidade previamente confirmada.

5.6.3. Avaliação da resposta ovulatória

Previamente à colheita de embriões, as ovelhas foram submetidas a um jejum hídrico e alimentar de 12 e 24 horas, respectivamente, no quinto dia após a primeira monta. No dia seguinte, imediatamente antes da colheita de embriões, as mesmas foram submetidas a uma laparoscopia a fim de verificar a resposta ovulatória, conforme descrito por Oldham e Lindsay (1980). Este método foi realizado através da inserção de um trocáter na cavidade abdominal, para criar passagem para o endoscópio que é utilizado para a visualização do trato reprodutivo, sem que os mesmos precisassem ser exteriorizados. Em seguida foi realizada mais uma punção por onde foi introduzida a pinça de manipulação dos órgãos do trato reprodutivo, para a melhor observação dos mesmos. Os animais foram previamente submetidos a plano anestésico, com a administração de Lidocaína (2%) administrado em pequenas doses, por via subcutânea, nos pontos de incisão.

5.6.4. Colheita de embriões

A colheita de embriões foi realizada por Laparotomia, conforme descrito por Loiola Filho (2013). Momentos antes da colheita, foi realizado um protocolo anestésico constituído de Sulfato de Atropina a 1% (Atrovene[®], Vila Real Saúde Animal, Brasil), como pré-anestésico (0,044 mg/kg) aplicado por via subcutânea, seguida pela aplicação de Cloridrato de Xilazina a 1% (Kensol[®], Laboratórios König, Argentina) (0,22 a 0,30 mg/kg) e, após 10 minutos, foi realizada a aplicação de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet[®], Bravet, Brasil), por via epidural alta (4,4 a 10 mg/kg). Em seguida, foi aplicado 4 mL de Cloridrato de Lidocaína a 2% na linha Alba, perfazendo uma linha de incisão de 7 a 15 cm. O trato reprodutivo foi, então, exteriorizado e, utilizando uma sonda de Foley n° 10 (Solidor[®], 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[®], Medcare PVT, Índia), na junção útero-tubárica, também de cada corno uterino. Com isso, foi realizada a injeção de 40 mL de DMPBS (DMPBS[®], Vitrocell, Brasil), em cada corno uterino, e o líquido, possivelmente, contendo os embriões, foi recuperado pela sonda de Foley, em um

tubo de 50 mL (Tubo de centrifugação[®], TPP, Suíça). 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 através de ponto simples separado, seguindo um protocolo padrão em três planos, utilizando fio de sutura absorvível n° 0 (Categute[®], Technofio, Brasil) nas camadas muscular e subcutânea, além de fio de sutura não absorvível n° 0 (Nylon[®], Technofio, Brasil) na pele.

5.6.5. Avaliação de embriões

Realizada a colheita, o lavado uterino foi vertido em placa plástica de Petri de 100 mm (Placa de Petri 100[®], Nutricell, Brasil), a qual foi levada para um estereomicroscópio (SMZ 645[®], Nikon, Japão) de luz fria, com aumento de 40 a 70x, onde as estruturas foram procuradas e, quando encontradas, avaliadas. Os embriões localizados foram colocados em placas plásticas de Petri de 35 mm (Placa de Petri 35[®], Nutricell, Brasil) contendo gotas de 50 µL de uma solução de DMPBS com 0,4% de albumina sérica bovina (DMPBS/BSA 0,4%[®], Nutricell, Brasil). Em seguida, os embriões foram avaliados quanto ao seu estágio e quanto o seu grau de qualidade, segundo os critérios de avaliação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON e NELSON, 2010). Com relação ao estágio, os embriões foram classificados em: embrião retardado (1 a 8 células), mórula inicial, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido. Quanto à qualidade dos embriões, foram considerados embriões de Grau 1 (excelente ou bom), Grau 2 (regular), Grau 3 (pobre) e Grau 4 (morto ou degenerado). Foram considerados para a avaliação morfológica apenas os embriões de Graus 1, 2 e 3.

Além disso, foi avaliada homogeneidade da massa quanto à cor e tamanho dos blastômeros, sendo classificados em embriões homogêneos, levemente heterogêneos ou heterogêneos (Figura 5); quanto ao nível de extrusão (Figuras 6), sendo considerado baixo quando o percentual de extrusão foi de 0 a 5%, médio quando o percentual de extrusão foi entre 6 a 15% e alto quando o nível de extrusão ultrapassou os 15%; presença ou ausência de retração da massa embrionária, classificada em: sem retração, levemente retraída, com retração (Figura 7).

Figura 5 – Classificação morfológica embrionária, quanto à homogeneidade da massa celular interna: (A) Homogênea, (B) Levemente Heterogênea, (C) Heterogênea (Fonte: Arquivo Pessoal).

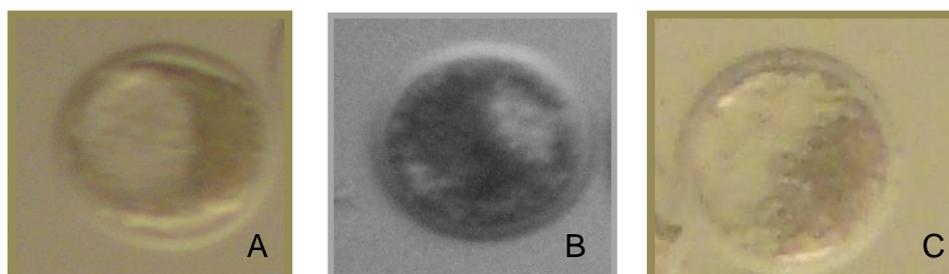


Figura 6 – Classificação morfológica embrionária, quanto à extrusão da massa celular interna: (A) Baixa – 0 à 5%, (B) Média – 6 à 15%, (C) Alta – >15%, (Fonte: Arquivo Pessoal).

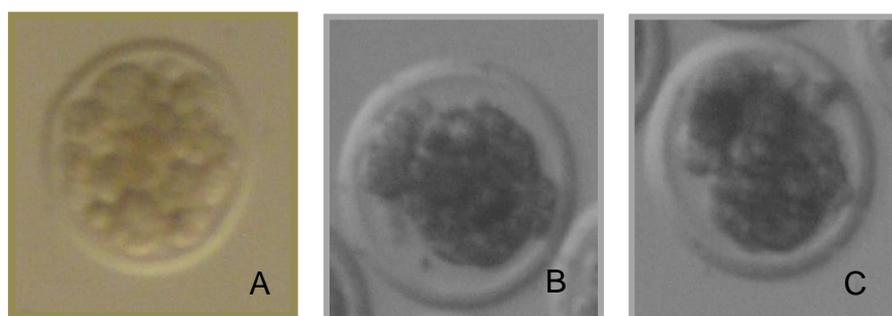
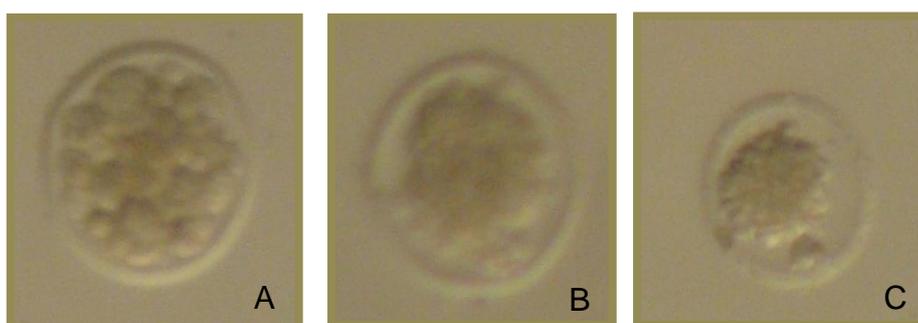


Figura 7 – Classificação morfológica embrionária, quanto à retração da massa celular interna: (A) Sem retração, (B) Levemente retraído, (C) Com retração, (Fonte: Arquivo Pessoal).



5.7. Parâmetros avaliados

Foram avaliados:

- Porcentagem de fêmeas em estro;
- Período entre o final do tratamento de sincronização e início do estro (h);
- Número de ovulações;
- Número de fêmeas superovulando (fêmeas cujo somatório de corpos lúteos em ambos os ovários, fosse maior ou igual a 5);
- Taxa de recuperação =
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ estruturas recuperadas}}{\text{N}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$
- Taxa de fecundação =
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ embriões}}{\text{N}^\circ \text{ de estruturas recuperadas}} \times 100$$
- Quantidade e qualidade dos embriões produzidos;
- Morfologia embrionária;
- Homogeneidade da massa quanto ao tamanho e cor dos blastômeros; Retração da massa celular interna, Porcentagem de extrusão.

5.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, entre os tratamentos alimentares, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan e foram consideradas, estatisticamente, diferentes quando apresentaram nível de significância menor que 5%. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Qui-quadrado. Foi utilizado o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (2013).

6. RESULTADOS

Dentre os vinte animais experimentais, apenas uma ovelha (Grupo UVA20) não apresentou sinais de estro e, posteriormente, foi possível determinar que a mesma apresentou ovulação silenciosa, já que respondeu ao tratamento superovulatório, o que foi possível observar através da Laparoscopia.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre grupos quanto a porcentagem de animais em estro. Nos Grupos Controle, UVA10 e UVA30, 100% dos animais apresentaram estro, enquanto no UVA20, 80%.

No tocante ao percentual de ovelhas ovulando, os animais de todos os grupos ovularam, porém, nem todos responderam ao tratamento superovulatório, não havendo também diferença significativa ($P>0,05$) no percentual de animais superovulando entre os grupos experimentais, sendo possível obter 60, 80, 60 e 80% de animais superovulando nos Grupos Controle, UVA10, UVA20 e UVA30, respectivamente. A Tabela 7 apresenta a resposta ovariana e a produção de embriões após a inclusão do resíduo de uva na alimentação. Para qualquer dos parâmetros avaliados, não houve diferença estatística nos tratamentos.

Tabela 7 – Valores médios (\pm e.p.) do intervalo entre a retirada do CIDR e início do estro (RCIDR-IE; h), números de corpos lúteos (CL), de estruturas recuperadas (embriões + oócitos), de embriões encontrados, bem como valores percentuais de taxas de recuperação e de fecundação de ovelhas deslanadas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (*Vitis vinifera*) e submetidas à produção *in vivo* de embriões.

Parâmetros	Grupos			
	Controle (0%)	UVA10 (10%)	UVA20 (20%)	UVA30 (30%)
RCIDR-IE (h)	26,4 \pm 3,1	26,4 \pm 3,1	28,8 \pm 3,0	25,6 \pm 3,1
Número de CL	5,0 \pm 1,9	6,2 \pm 1,9	6,2 \pm 1,9	6,8 \pm 1,9
Número de estruturas	5,3 \pm 1,6	4,3 \pm 1,4	3,5 \pm 1,4	5,6 \pm 1,6
Número de embriões	4,3 \pm 1,5	3,6 \pm 1,2	4,0 \pm 2,0	5,6 \pm 1,2
Taxa de recuperação	63,7 \pm 13,7	69,0 \pm 6,6	83,3 \pm 16,7	100,0 \pm 0,0
Taxa de fecundação	85,7 \pm 14,3	91,7 \pm 8,3	83,3 \pm 16,7	100,0 \pm 0,0

$P>0,05$.

Com relação à qualidade embrionária, de forma geral, a inclusão da farinha de uva na alimentação de doadoras de embriões ovinos exerceu um incremento na qualidade dos embriões colhidos, sob alguns aspectos.

Dentro de cada grau de qualidade embrionária (Tabela 8), não foi observada diferença estatística entre níveis de inclusão de uva na ração ($P>0,05$). Porém, foi comprovada a eficácia do protocolo, sem qualquer interferência negativa da inclusão de uva na ração, pois, para todos os níveis de inclusão, ocorreu o predomínio significativo de embriões Excelentes (Grau 1) ($P<0,05$).

Tabela 8 – Graus de qualidade de embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (*Vitis vinifera*).

Qualidade Embrionária	Grupos			
	Controle (0%)	UVA10 (10%)	UVA20 (20%)	UVA30 (30%)
Grau 1 (n)	69,2% (9) ^A	73,3% (11) ^A	83,3% (10) ^A	82,3% (14) ^A
Grau 2 (n)	15,4% (2) ^B	20,0% (3) ^B	8,30% (1) ^B	0,00% (0) ^B
Grau 3 (n)	15,4% (2) ^B	6,70% (1) ^B	0,00% (0) ^B	0,00% (0) ^B
Grau 4 (n)	00,0% (0) ^B	0,00% (0) ^B	8,30% (1) ^B	17,7% (3) ^B

^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Qui-quadrado ($P<0,05$).

Com relação às características morfológicas (Tabela 9), mais especificamente, para o parâmetro retração de massa embrionária, não houve diferença entre níveis de inclusão, dentro de cada categoria de retração ($P>0,05$). Porém, foi comprovada, mais uma vez, a eficácia do protocolo, sem qualquer interferência negativa da inclusão de uva na ração, pois, para todos os níveis de inclusão, ocorreu o predomínio significativo de ausência de retração da massa embrionária ($P<0,05$).

A porcentagem de embriões homogêneos, com relação ao tamanho dos blastômeros, foi superior no Grupo UVA30, quando comparado aos demais grupos de tratamentos, como mostra a Tabela 10 ($P<0,05$). Foi observado, ainda, que, dentro do Grupo Controle, ou seja, quando os animais não receberam uva na ração, houve o predomínio significativo de embriões de tamanho dos blastômeros levemente heterogêneo ($P<0,05$).

Tabela 9 – Percentual de retração da massa de embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (*Vitis vinifera*).

Grau de Retração	Grupos			
	UVA (0%)	UVA10 (10%)	UVA20 (20%)	UVA30 (30%)
Ausente (n)	92,3% (12) ^A	78,6% (11) ^A	100,0% (11) ^A	85,7% (12) ^A
Leve (n)	7,7% (1) ^B	14,3% (2) ^B	0,0% (0) ^B	0,0% (0) ^B
Com retração (n)	0,0% (0) ^B	7,1% (1) ^B	0,0% (0) ^B	14,3% (2) ^B

^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Qui-quadrado (P<0,05).

Tabela 10 – Porcentagem de homogeneidade da massa embrionária com relação ao tamanho dos blastômeros embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (*Vitis vinifera*).

Homogeneidade embrionária	Grupos			
	Controle (0%)	UVA10 (10%)	UVA20 (20%)	UVA30 (30%)
Homogênea (n)	15,4% (2) ^{bB}	42,9% (6) ^b	36,4% (4) ^b	85,7%(12) ^{aA}
Levemente Heterogênea (n)	61,5% (8) ^{aA}	57,1% (8) ^a	63,6% (7) ^a	14,3% (2) ^{bB}
Heterogênea (n)	23,1% (3) ^B	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0) ^B

^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Qui-quadrado (P<0,05).

^{a, b} Valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha são diferentes pelo teste de Qui-quadrado (P<0,05).

Com relação à homogeneidade pela cor, a proporção de embriões homogêneos do Grupo UVA30 foi superior que a do Grupo UVA10 (P<0,05) (Tabela 11).

Tabela 11 – Porcentagem de homogeneidade da massa embrionária com relação à cor dos blastômeros embriões de ovelhas deslanadas submetidas a diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (*Vitis vinifera*).

Homogeneidade embrionária	Grupos			
	Controle (0%)	UVA10 (10%)	UVA20 (20%)	UVA30 (30%)
Homogênea (n)	53,8% (7) ^{ab}	50,0% (7) ^b	54,5% (6) ^{ab}	85,7%(12) ^{aA}
Levemente Heterogênea (n)	46,2% (6) ^{ab}	50,0% (7) ^b	45,5% (5) ^{ab}	14,3% (2) ^{aB}
Heterogênea (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0) ^B

^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Qui-quadrado ($P<0,05$). ^{a, b} Valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha são diferentes pelo teste de Qui-quadrado ($P<0,05$).

Já com relação à extrusão embrionária, a proporção de embriões sem extrusão foi superior ($P<0,05$) no grupo UVA30, quando comparado aos demais grupos experimentais, como mostra a Tabela 12.

Tabela 12 – Proporção de embriões sem extrusão de embriões de ovelhas deslanadas submetidas diferentes níveis de inclusão de farinha de resíduo de uva (*Vitis vinifera*).

Extrusão (%)	Grupos			
	Controle (0%)	UVA10 (10%)	UVA20 (20%)	UVA30 (30%)
0 a 5 (Baixo)	30,8% (4) ^{bAB}	35,7% (5) ^b	54,5% (6) ^{bA}	92,9 (13) ^{aA}
6 a 15 (Médio)	53,8% (7) ^{bA}	42,9% (6) ^b	36,4% (4) ^{abAB}	7,1% (1) ^{aB}
> 15 (Alto)	15,4% (2) ^B	21,4% (3)	9,1% (1) ^B	0,0% (0) ^B

^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Qui-quadrado ($P<0,05$). ^{a, b} Valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha são diferentes pelo teste de Qui-quadrado ($P<0,05$).

7. DISCUSSÃO

Apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos experimentais no que diz respeito à resposta ovariana, foi possível observar diferença com relação a alguns parâmetros morfológicos dos embriões, em que o grupo que recebeu maior quantidade de uva, em substituição ao concentrado (UVA30), apresentou melhores características quanto à morfologia embrionária.

Com relação à resposta estral, nos Grupos Controle, UVA10 e UVA30, 100% dos animais apresentaram estro, não diferindo estatisticamente do grupo UVA20, o qual apresentou 80% o que corrobora aos achados por Sonmez et al. (2009), que obtiveram 100% de cabras em estro, após serem submetidas a sincronização de estro, recebendo uma fonte de antioxidante.

Esses dados foram semelhantes também, aos achados por Vilariño et al. (2013) e por Padilha et al. (2011), que, utilizando protocolo semelhante, obtiveram 100% de cabras e ovelhas em estro, respectivamente.

Com relação ao intervalo entre a retirada do CIDR e o início do estro, os valores encontrados foram semelhantes aos achados por Carvalho (2009), que obteve intervalo máximo de 30 horas. Esses resultados devem-se ao desbloqueio mais eficiente do eixo hipotalâmico-hipofisário após o fim do tratamento de sincronização, utilizando progesterona natural.

Não houve diferença no percentual de animais superovulando entre os grupos experimentais, nos quais não houve totalidade de animais, respondendo ao tratamento superovulatório, também não houve diferença entre o número de corpos lúteos. Os valores encontrados para esses parâmetros foram considerados satisfatórios e podem ser explicados pela correlação entre o início do estro e o número de corpos lúteos produzidos. Pois, quanto mais precoce for o início do estro, maior a quantidade de corpos lúteos produzidos, o que pode ser atribuído ao maior número de folículos pré-ovulatórios produtores de estrógeno, ao final do tratamento de sincronização do estro, nos animais com maior número de corpos lúteos (KATANYA, PAWEL e KING, 2009).

Além disso, a quantidade de ovulações e, conseqüentemente, de corpos lúteos produzidos foi considerada ideal porque atendeu o número mínimo para se considerar que houve superovulação e ao mesmo tempo não foi tão alta a ponto de promover um quadro de hiperestrogenismo, que pode ocorrer em animais que apresentem uma resposta ovariana excessiva à gonadotrofina e que acarreta, dentre

outros efeitos, em alteração da contratilidade uterina e dificuldade no transporte espermático, o que reduziria a fecundação dos oócitos produzidos (PALOMAR, 1997).

A fêmea que não apresentou sinais de estro, bem como as demais que não responderam ao tratamento superovulatório, eram todas nulíparas e tinham idade de, aproximadamente, 18 meses. Eram as mais jovens, dentre os animais experimentais. Assim sendo, a falta de resposta ao estímulo do tratamento superovulatório pode ser explicada pelo fato de que em borregas, os ciclos estrais são menos regulares e a incidência de estro silencioso é mais frequente, principalmente naquelas que apresentam baixa taxa de crescimento. Além disso, a taxa de ovulação é menor e a taxa de mortalidade embrionária mais elevada em borregas do que em ovelhas, o que está relacionado com uma insuficiente produção de hormônios relacionados à reprodução (SÁ e SÁ, 2011).

A inexistência de efeito da suplementação com farelo do resíduo da uva (*Vitis vinifera*) sobre a taxa de ovulação nas ovelhas sugere que o aumento da mesma pode depender do estado folicular no início do tratamento nutricional (VIÑALES et al., 2005).

Apesar de não ter havido diferença significativa para os parâmetros ovulatórios, houve uma tendência do Grupo UVA30 a apresentar melhores resultados, com menor intervalo entre a retirada do CIDR e o início do estro, maior número de ovulações, maior número de embriões e maiores taxas de recuperação e fecundação. Isso pode ser decorrente da maior quantidade de uva e, conseqüentemente, maior teor de tanino fornecido a esse Grupo UVA30. O tanino, considerado um antioxidante da dieta, tem, como função, “sequestrar” as Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) oriundas do metabolismo celular que, por ventura, sejam produzidas em excesso, impedindo que as mesmas atuem sobre lipídios e aminoácidos, e, assim, evitando a ocorrência de danos causados à membrana celular e ao DNA (ANDRADE et al., 2010; AMIRIDIS e CSEH, 2012). Com isso, o tanino pode auxiliar na manutenção da integridade de espermatozoides e oócitos, fazendo com que desempenhem corretamente suas funções, além de ser capaz de reduzir os empecilhos ao transporte espermático e impedir a poliespermia (PRATHER e DAY, 1998).

Para os parâmetros reprodutivos número de corpos lúteos, estruturas recuperadas e número de embriões, todos os grupos apresentaram valores

estatisticamente semelhantes, o que corrobora com resultados encontrados por Arruda et al. (2013), utilizando subproduto da mandioca e do caju, na suplementação de ovelhas para avaliar o seu efeito na produção *in vivo* de embriões.

Segundo Rodrigues (2010), os ovinos apresentam taxa de ovulação sensível ao fornecimento nutricional em, aproximadamente, 10 dias antes da monta, tendo efeito estimulatório benéfico, coincidindo com o aparecimento da onda folicular. Sendo assim, pode-se afirmar que, em nosso trabalho, o fornecimento da dieta ocorreu em tempo hábil para obter respostas. A inexistência de diferenças entre os grupos tratados pode ser explicada tanto pelo número reduzido de animais utilizados, quanto pelo fato de que, apesar da utilização de diferentes ingredientes para a composição da ração, todas eram isoproteicas e isoenergéticas, fornecendo o mesmo aporte nutricional aos animais, os quais não sofreram influência dos ingredientes, fornecidos em quantidades diferentes em cada grupo.

De forma geral, a inclusão da farinha de uva na alimentação de doadoras de embriões ovinos exerceu um incremento na qualidade dos embriões colhidos sob os diversos aspectos. Dentro de cada grau de qualidade embrionária (Tabela 8), não foi observada diferença estatística entre níveis de inclusão de uva na ração. Porém, foi comprovada a eficácia do protocolo, sem qualquer interferência negativa da inclusão de uva na ração, pois, para todos os níveis de inclusão de uva, ocorreu o predomínio significativo de embriões Excelentes. Esses dados corroboram com os encontrados por Arruda et al. (2013), os quais, trabalhando com cabras alimentadas com coproduto de caju desidratado e a raspa de mandioca como substitutos parciais de cereais, obtiveram uma boa produção embrionária e um maior número de embriões transferíveis, ou seja, o somatório dos embriões de Graus de Qualidade 1, 2 e 3. E foram semelhantes também aos achados por Nascimento (2008), que, trabalhando com cabras Saanen, adicionou na dieta alimentar, 25 mg de selênio, que, assim como o tanino, também tem função antioxidante, observou um maior número de embriões viáveis. O autor atribui esse resultado a capacidade do selênio, em inativar as EROs.

O aumento da quantidade de embriões homogêneos quanto ao tamanho dos blastômeros e proporção de embriões sem extrusão no grupo UVA30, podem ser explicados devido à maior quantidade de uva e, conseqüentemente, maiores teores de tanino fornecido ao grupo UVA30, uma vez que esse possui importante papel antioxidante, neutralizando os EROs, reduzindo os danos das estruturas celulares.

Isso porque, apesar do fato de que as EROs serem formadas nas células durante o seu metabolismo normal, quando a sua formação excede a capacidade do organismo em eliminá-los, essas espécies ficam livres e se ligam a moléculas eletronicamente instáveis (ARAÚJO, 2008). Esse é o caso da molécula de DNA, que possui carga negativa. Assim, a ligação de uma ERO ao DNA, o que ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro*, causa danos ao mesmo (ANDRADE et al., 2010), o que, provavelmente, tenha promovido um maior desenvolvimento assíncrono dos blastômeros e uma maior porcentagem de extrusão nos embriões oriundos de ovelhas que receberam uma menor quantidade de farinha de uva, recebendo, conseqüentemente, menos quantidade de tanino. Desse modo, podem ter ocorrido alterações mitocondriais e bloqueio do desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2002), uma vez que a ativação oocitária mediada pelo espermatozoide e a ativação do genoma embrionário, aumentam a produção de EROs (LIVINGSTON et al., 2009).

8. CONCLUSÕES

O resíduo da uva não é capaz de promover melhorias quantitativas e qualitativas na resposta ovariana e produção embrionária, mas em substituição a 30% do concentrado, mostrou-se capaz de melhorar a homogeneidade da massa quanto ao tamanho dos blastômeros e reduzir a taxa de extrusão. Além disso, não traz efeitos negativos aos parâmetros reprodutivos de modo geral. Portanto, o resíduo de uva pode ser utilizado, como fonte alimentar alternativa, na alimentação de ovelhas deslanadas submetidas à produção *in vivo* de embriões.

9. REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 173–179, 2012.
- AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Tecnologias de reprodução assistida no manejo reprodutivo de pequenos ruminantes. **Ciência e Reprodução Animal**, v. 130, p. 152-161, 2012.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, p.79-85, 2010.
- ANTONIOLLI, C. B. **Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação**. 2002. Disponível em: <<http://vetarquivos.blogspot.com/2009/10/desenvolvimento-folicularondas.html>>
- ARAÚJO, M. A. J. **Química dos alimentos - Teoria e prática**. 4ª edição, Viçosa - UFV. 2008, p. 596.
- ARRUDA I. J. et al. Produção de embriões *in vivo* e expressão dos genes IGF-IR, IGF-II, GLUT-I e HSP 70.1 em embriões de cabras alimentadas com bagaço de caju desidratado ou raspa de mandioca. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 20, p. 54-58, 2013.
- ASHWORTH, C.J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 99-105, 1995.
- BARI, F. et al. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. **Theriogenology**, v. 59, p. 1265-1275, 2003.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manual de Formación Práctica para el Trasplante de Embriones en Ovejas y Cabras**. FAO, Roma, 1995, p.182.
- BARRETT, D.M.W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, p. 311–327, 2004.
- CARVALHO, J. A. **Sincronização do estro e da ovulação em ovelhas da raça Santa Inês após tratamento com CIDR novo ou reutilizado associado à eCG ou GnRH**. 2009. Dissertação (Programa de Pós Graduação de mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2009.
- CASTILHO, C. et al. Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p. 91-97, 2013.
- CHOUDHURY, M. M.; COSTA, T. S. **Colheita e pós colheita da videira**, 2004. <http://sistemasdeproducao.cnptia.bbembrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/colheita.htm>. Acesso em 28 de julho de 2013.

Composição Química e Bioquímica de Alimentos (CQBAL 3.0) 2012. Disponível em: <http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/en/index.php>. Acesso em 05 de dezembro de 2012.

CUNNINGHAM, J.G, **Tratado de fisiologia**, 4ª edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2008, p. 469-470.

DELIGIANNIS, C. et al. Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 6–10, 2005.

DUNNE L. D. et al. Nutrition and embryo survival in cattle. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, v. 36, p. 95, 1997.

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. 669–679, 2002.

EHLING, C. et al. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, onseved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, v. 60, p. 777–787, 2003.

EMBRAPA SEMIÁRIDO 2009. **Médias Anuais da Estação Agrometeorológica de Bebedouro**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/servicos/dadosmet/ceb-anual.html>>, acessado 15/04/2013.

EVANS, A. C. O. et al., Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, p. 699–715, 2000.

FERNANDES, C. A. C. **Superovulação em bovinos**. Alfenas-MG, 2003.

FONSECA J. F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos**. Embrapa Caprinos, CP D10, CEP 62011-970, Sobral, Ceará, Brasil. 2005.

FORCADA, F. et al. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 769–776, 2011.

FREITAS, V. J. F.; SIMPLÍCIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1ª Ed. São Paulo: Varela, Cap. 9, 2001, p.179-194.

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. 2004, p.33-54.

HAWK, H. W.; COOPER, B. S.; CONLEY, H. H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. **Theriogenology**, v. 28, p. 139-153, 1987.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo agropecuário**. 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm

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

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H., HAFEZ, E. S. E. **Reproductive cycles: sheep and goats**. In: Hafez, E.S.E., Hafez, B. (Eds.), *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition. Williams & Wilkins Lippincott, Philadelphia, 2004, p. 172–181.

KATANYA, J. F.; PAWEL, M. B.; KING, W.A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v. 82, p. 144–148, 2009.

LAIZA, B. Principais raças deslanadas de ovinos criados no Brasil. **Portal Agropecuário**, 2 de Março de 2012. Disponível em: <
[http://www.portalagropecuario.com.br/ovinos-e-caprinos/criacao-de-ovelhas /
conheca-as-principais-racas-deslanadas-de-ovinos-criadas-no-brasil/](http://www.portalagropecuario.com.br/ovinos-e-caprinos/criacao-de-ovelhas/conheca-as-principais-racas-deslanadas-de-ovinos-criadas-no-brasil/)>.

LIU, H. et al. Influence of chestnut tannins on welfare, carcass characteristics, meat quality, and lipid oxidation in rabbits under high ambient temperature. **Meat Science**, v. 90, p. 164–169, 2011.

LIMA-VERDE, J. B. et al. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **South African Society for Animal Science**, v.33, p.127-131, 2003.

LIVINGSTON, T. et al. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p.265-273, 2009.

LOIOLA FILHO, J. B. **Efeito da dose de pFSH na produção *in vivo* de embriões em ovelhas Dorper pertencentes a duas categorias de peso corporal**. 2013. 70f: Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2013.

MAGGIONI, D. et al. Influência da proteína sobre a reprodução animal. **Campo Digital**, v.1, p.105-110, 2008.

MANTOVANI, R. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. Proceedings of the 9th meeting of the **Association Europeenne de Transfert Embryonnaire**, Lyon, 1993, p. 234.

MARTEMUCCI, G; D'ALESSANDRO, A. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate treatments. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 41–47, 2010.

MAULÉON, P; DAUZIER, K. Variations de durée de l'anoestrus de lactation chez les brebis de race Ile-de-France. **Annales de Biologie Animale Biochimich Biophysic**, v. 5, p.131, 1965.

McEVOY, T. G et al. Feed and forage toxicant affecting embryo survival and fetal development. **Theriogenology**, v.55, p.113–129, 2001.

MONTE, A. P. O. **Adição de sacarose na solução crioprotetora de vitrificação de embriões ovinos Dorper produzidos *in vivo***. 2013. 71 f: Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2013.

MURRAY, J. F. et al. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. **Theriogenology**, v. 42, p. 1337–1347, 1994.

NASCIMENTO, E. E. **Suplementação de selênio na dieta de caprinos sobre a produção e qualidade de embrião**. 2008. Dissertação (Mestrado em zootecnia). Universidade Estadual de Maringá – Paraná, 2008.

NRC. **Nutrient Research Council**. 2007. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309035961>. p 43-78. 1985.

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, G. J. C. A raça Santa Inês no contexto da expansão da ovinocultura In: **SIMPÓSIO MINEIRO DE OVINOCULTURA: PRODUÇÃO DE CARNE NO CONTEXTO ATUAL**, 1., 2001, Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA, p.121, 2001

OLIVEIRA, M. E. F. **Parâmetros quali-quantitativos na seleção de receptora sem programas de transferência de embriões ovinos**, 2009, p. 25-31.

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>>.

PADILHA, T. R. et al. Efeito de diferentes dispositivos intravaginais na sincronização estral e taxa de gestação em ovelhas deslanadas submetidas à IATF via cervical superficial com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.6, n.3, p.538-543, 2011.

PALOMAR, A. R. R. **HIPERESTROGENISMO EN PERROS**. III Congreso Internacional de la ALEEMVET. Guanajuato, México. 1997.

PASA, C. Relação reprodução animal e os minerais. **Revista Biodiversidade**, v. 9, p.101-122, 2010.

PAULA, N. R. O. **Parâmetros clínicos, hematológicos, sorológicos e reprodutivos em reprodutores natural e experimentalmente infectados com CAEV**. 2008. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária – UECE, Forataleza-CE, 2008.

PEREIRA, R. J. T. A.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2-alpha and oxytocin. **Journal of Animal Science**, v.76, p.360-363, 1998.

PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. **Theriogenology**, v. 49, p. 23-32, 1988.

RAMÍREZ, C. A. Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive efficiency in ewes under commercial dryland farming conditions. **Technology**, v. 121, p. 23-43, 2005.

RILEY, J. K.; MOLEY, K. H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction**, v.131, p.823-835, 2006.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certification and identification of embryos. In: D. A. Stringfellow; M.D. Givens (eds.), **Proceedings of Guide of International embryo Transfer Society**, 2010, 86-105.

RODRIGUES, F. V. **Resposta ao tratamento de sincronização do estro com aplicação de prostaglandina em cabras com baixo estado nutricional**. 2010. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

ROTAVA, R. **Subprodutos da uva para utilização em dietas de frango de corte**. 2007. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 271–287, 2003.

SÁ, C. O.; SÁ, J. L. 2011. **Idade a Primeira Cria de Borregas**: extensão (On line, <http://www.crisa.vet.br>, s.d.).

SALLES, H. O.; SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-Nubiana. **Ciência Animal**, v.10, p.137-138, 2000.

SCARAMUZZI, R. J. et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition and Development**, v.46, p.339–354, 2006.

SELVARAJU, S. et al. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats. **Theriogenology**, v. 59, p. 1459-1468, 2003.

SILVA, D. F. et al. **Exploração da caatinga no manejo alimentar sustentável de pequenos ruminantes**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte:UFMG, 2004.

SONMEZ, M. M. et al. The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive performance of goats following estrous synchronization using intravaginal sponges. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 183–192, 2009.

SPENCER, T. E. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.537-550, 2004.

TROUSON, A. O.; MOORE, N. W. Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination. **Australian Journal of Biological Science**, v. 27, p. 301-304, 1974.

VALEXPOR. **Há 14 anos unindo forças para o desenvolvimento do Vale do São Francisco**. Petrolina - PE: 2002, p. 16.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n. 2, p.100-109, 2008.

VILARIÑO, M.; RUBINAES, E.; MENCHACA, A. Ovarian response and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v.79, p.206-210, 2013.

VIÑALES, C. et al. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 5, 2005, p.1470–1626, p. 1741–7899 (online).

WANG, X. et al. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, p.1272-1277, 2002.

WILLIAMS, A. H.; CUMMING, I. A. Inverse relationship between concentrations of progesterone and nutrition in ewes. *Journal of Agriculture Science*, v.98, p.517-522, 1982 *apud* SQUIRES, T. J. et al. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Veterinary Science**, p. 306-310, 1993.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; DUFFY, P.; DUBY, R. T.; BOLAND, M. P. Effect of concentrate type and quality on superovulation in cattle. **Proceedings of Techniques for gamete manipulation and storage**. Hamilton, New Zealand, 1996, p.37.