



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

Lívia Correia Magalhães

**EFEITO DO PROTOCOLO DIA 0 E DO DILATADOR
CERVICAL MISOPROSTOL NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
DE OVELHAS MISTIÇAS (DORPER VS. SANTA INÊS)
EXPLORADAS NO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

Petrolina – PE
2013

Lívia Correia Magalhães

**EFEITO DO PROTOCOLO DIA 0 E DO DILATADOR
CERVICAL MISOPROSTOL NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
DE OVELHAS MISTIÇAS (DORPER VS. SANTA INÊS)
EXPLORADAS NO 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. Mabel Freitas Cordeiro e Prof. Dr. Pedro Humberto Félix de Souza.

Petrolina – PE
2013

M188e Magalhães, Livia Correia
Efeito do protocolo dia 0 e do dilatador cervical misoprostol na produção de embriões de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa inês) exploradas no submédio São Francisco/Livia Correia Magalhães. -- Petrolina, 2013.
XVIII; 73f.: il. 29 cm.

Dissertação (Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2013.

Orientador (a): Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior

1. Biotecnologia. 2. Colheita transcervical. 3. MOTE. 4. Ovino.
I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD 660.6

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Correia Magalhães

**EFEITO DO PROTOCOLO DIA 0 E DO DILATADOR CERVICAL MISOPROSTOL
NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE OVELHAS MISTIÇAS (DORPER VS. SANTA
INÊS) EXPLORADAS NO 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: 29 de Novembro de 2013.

Banca Examinadora

Edilson Soares Lopes Júnior

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

Mabel Freitas Cordeiro

Mabel Freitas Cordeiro, Dra., Universidade Federal do Vale do São Francisco

Pedro Humberto Félix de Souza

Pedro Humberto Félix de Souza, Dr., Universidade do Estado da Bahia

Vicente José de Figueirêdo Freitas

Vicente José de Figueirêdo Freitas, Dr., Universidade Estadual do Ceará

Petrolina
2013

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida e pela presença constante em meus dias. Aos meus amados pais Cenira Correia e Euvaldo Magalhães, por todo amor, confiança e apoio incondicional, neste e em todos os desafios por mim enfrentados. A minha irmã Thaís, por ser um presente especial de Deus em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS. Sem Ele jamais chegaria até aqui. Há muito que percorrer ainda, sei dos obstáculos que estão por vir, mas tenho a certeza que sua companhia me impulsiona, fortalece, me dá a paz e sabedoria que necessito para prosseguir sempre adiante sem temer mal algum. Obrigada também Senhor por cobrires sempre de bênçãos a mim e a todos que amo, muito obrigada!

Aos seres especiais a quem Deus me presenteou para me proteger, guiar, aconselhar, serem meus amigos e acima de tudo, PAI e MÃE. Meus pais, meus exemplos de caráter, honestidade, simplicidade, meus amores lindos. As pessoas em quem me espelho. Obrigada pela união de vocês dois, por me darem a melhor família do mundo e por acreditar e sonhar sempre comigo! É por vocês e pra vocês que eu luto diariamente em busca de novas conquistas e de me tornar uma pessoa melhor. Como se não bastasse todo esse amor sem limites, vocês me presentearam da forma mais sublime, com minha irmã! Thaís, mais do que me completa, você me transborda, aflora em mim os sentimentos mais puros. Não tem palavras pra definir, não inventaram ainda o sentimento que tenho por você, é muito mais do que amor. Obrigada por estar sempre comigo em todas as situações, por ser minha companheira, confidente, cúmplice, por ser uma extensão de mim. A todos os meus familiares, que sempre torcem e vibram com cada conquista minha, meu muito obrigada!

Ao meu orientador e amigo, Edilson Soares Lopes Júnior, ou melhor: Tatá! Obrigada por acreditar que eu sou capaz, obrigada por todos os ensinamentos, apoio, incentivo, paciência, obrigada pela sua amizade todo esse tempo. Deus não poderia ter escolhido ser humano melhor para me orientar durante todo esse tempo, com tanta dedicação e zelo, como você faz. Agradeço por ter me dado o direcionamento pela pesquisa, desde os tempos da graduação. Você é um exemplo de profissional, professor, educador, orientador pra mim. Por mais que eu tente, acredito que nunca vou poder retribuir de alguma forma todo o bem que você me fez. Meu PAI CIENTÍFICO, obrigada por sempre cuidar de mim, você sabe que é muito especial na minha vida, é alguém de quem eu não vou me despedir nunca apesar de qualquer que seja a nossa distância geográfica, pois sei que você vai estar sempre comigo. Estarei sempre com você também!

A todos da minha família científica encantada do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), por todos os momentos de aprendizado e alegrias. Obrigada pelo apoio no meu trabalho, por me darem força nos momentos difíceis e por confiarem em mim. A união da nossa família é que faz sempre a diferença e é ela que reflete no sucesso deste e dos muitos trabalhos que ainda serão realizados. Obrigada especial a Profa. Mabel Freitas Cordeiro, por cuidar com tanto carinho de todos nós, nossa MAMÃE CIENTÍFICA. Obrigada professora, por fazer a diferença nos detalhes, por se dedicar por inteiro, você veio pra somar e faz isso como ninguém, você é um ser humano maravilhoso! Obrigada as minhas irmãs científicas, Mayara e Thaís, é difícil falar de vocês e do quanto representam pra mim, Deus é bom demais comigo, vocês mais do que ninguém acompanharam e sentiram junto comigo todas as emoções que vivi nessa trajetória, amo cada uma de vocês duas como a mim mesma, juntas independente de qualquer coisa, sei que vamos mais longe. A minha filhotinha científica, Aionne Guimarães, por ser meu braço esquerdo, direito, tronco e pernas... fui abençoada em te conhecer e poder participar da sua vida profissional, amo muito você! A minha guru, Alane Pains, já te conhecia antes, mas só a nossa convivência foi capaz de me fazer enxergar a pessoa maravilhosa que você é, obrigada por tudo! Arlete, Cintia, Hícaro, Ludy, Naty, Yane.. obrigada por cada momento mágico, vocês moram em meu coração!

Ao Daniel Maia, pesquisador da EMBRAPA SEMIÁRIDO, por contribuir com seu imenso conhecimento na minha vida científica. Sempre com muita disposição e sabedoria, mesmo longe se faz muito presente em cada atividade realizada pelo nosso grupo. Gosto muito de você!

As minhas amigas, meus anjos sem asa, por entenderem minha ausência em alguns momentos de trabalho, por apoiarem sempre minhas decisões, por me mostrarem quando estou errada e por fazerem parte dos melhores momentos da minha vida, que é fácil, como minhas amigas vocês fizeram e fazem muito mais que isso, vocês me seguram e me dão a mão nos momentos ruins também. Com vocês é muito mais simples! É por isso que digo que sou muito abençoada pelo amor de cada uma de vocês: Tamy, Carol, Mary, Thiara, Lare, Alice.

Ao meu namorado, Carlos Henrique, por ser a pessoa certa, no lugar certo e, principalmente, no momento certo. Obrigada por em tão pouco tempo se tornar tão especial pra mim.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Mabel Freitas Cordeiro, Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas e Prof. Dr. Pedro Humberto Félix de Souza, que gentilmente aceitaram contribuir com este trabalho.

Ao laboratório Hebron, na pessoa de Carmen, por estabelecer uma parceria entre empresa e pesquisa e nos ceder, gentilmente, todo o Prostokos (Misoprostol) utilizado no presente experimento.

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB), em nome dos Médicos Veterinários Marconi e Pedro Humberto, pela parceria construída, por todo apoio e infraestrutura que nos foi dado.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, através do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por todo apoio que nos é dado, especial a querida Rosângela Fonseca por ser sempre tão solícita e atenciosa.

A FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Enfim, a todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente com o desenvolvimento desse trabalho, serei eternamente grata.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Objetivando avaliar o efeito de diferentes protocolos de superovulação e do uso de um dilatador cervical na produção *in vivo* de embriões em ovelhas do submédio São Francisco, foram utilizadas, como doadoras de embriões, 24 ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês, que igualmente distribuídas em dois grupos. No primeiro, Protocolo Tradicional, as doadoras foram sincronizadas com CIDR por 14 dias e superovuladas com 240 mg de pFSH, 60 horas antes do final do tratamento com progesterona, divididas em oito doses decrescentes (50/50; 36/36; 24/24; 10/10 mg), em intervalos de 12 horas. Já as doadoras do segundo grupo, Protocolo Dia 0, foram submetidas ao protocolo curto de sincronização do estro e superovuladas 84 horas após a remoção do CIDR do mesmo modo que o grupo anterior. As colheitas de embriões foram feitas pelo método Transcervical. As doadoras foram redistribuídas em dois subgrupos: Grupos Controle (sem dilatador) e Misoprostol, onde se utilizou um análogo da PGE1, o Misoprostol, 6 h antes da colheita. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher e Qui-quadrado. Quando estes não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Nenhuma diferença significativa ($P>0,05$) foi encontrada quanto à resposta ovariana após o tratamento superovulatório, sendo ambos eficientes, apresentando $17,55 \pm 3,48$ e $14,00 \pm 2,63$ corpos lúteos, para o protocolo Tradicional e Dia 0, respectivamente. Também não houve diferença entre os protocolos hormonais com relação à qualidade ou viabilidade embrionária ($P>0,05$). Com relação à colheita transcervical, esta não foi possível em 63,64% no grupo Controle e em 36,36% do Grupo Misoprostol, não havendo diferença entre os grupos ($P>0,05$). Pode-se concluir que o Protocolo Dia 0 não foi superior ao Tradicional, e que a colheita transcervical pode ser realizada em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês com ou sem o uso do Misoprostol.

Palavras-chave: Biotecnologia. Colheita transcervical. MOTE. Ovino.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of different superovulation protocols and the use of a cervical dilator on in vivo embryo production in ewes from sub-medium São Francisco, it was used as embryo donors, 24 crossbred ewes of Dorper X Santa Inês, which were equally divided into two groups. In the first, Traditional Protocol, donors were synchronized with CIDR for 14 days and superovulated with 240 mg pFSH 60 hours before the end of progesterone treatment, divided into eight decreasing doses (50/50, 36/36, 24/24, 10/10 mg) every 12 hours. Females from second group, Day 0 Protocol, were subjected to Short-Term estrus synchronization treatment and they were superovulated 84 hours after CIDR removal at the same way as the previous group. The embryo collections were performed by Transcervical method. Donors were redistributed into two subgroups: Control (No Dilator) and Misoprostol groups. Ewes from Misoprostol group received an analogue of PGE₁, misoprostol, 6 h before embryo collection. The results were expressed as mean \pm standard error mean. For comparison of the various parameters, we used analysis of variance. Means were compared by Tukey test and data expressed in percentages were subjected to Fisher's and Chi-square tests. When they did not show normal distribution they were tested for Kruskal Wallis. No significant difference was found regarding the ovarian response following superovulatory treatment, presenting 17.55 ± 3.48 and 14.00 ± 2.63 corpora lutea at Traditional and Day 0 protocols, respectively. There was no difference between the hormonal protocols regarding quality or embryo viability ($P > 0.05$). Transcervical embryo collection was not possible in 63.64% in Control group and 36.36% at Misoprostol group, with no significant difference between groups ($P > 0.05$). It can be concluded that Day 0 Protocol was not superior to Traditional protocol and that the transcervical collection can be performed in crossbred ewes of Dorper X Santa Inês with or without the use of misoprostol.

Keywords: Biotechnology. MOET. Sheep. Transcervical embryo recovery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | Página |
|--|--------|
| <p>Figura 1. (A) 1 comprimido de 200 µg de Misoprostol, (B) maceração do comprimido, (C) diluição do comprimido em 5 mL de solução fisiológica e (D) administração no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, com auxílio de uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial</p> | 49 |
| <p>Figura 2. Colheita transcervical. (A) Bloqueio anestésico; (B) inseção do espéculo de Collins vaginal lubrificado; (C), (D) Pinçamento e tracionamento das bordas do ósteo cervical com o auxílio de duas pinças de Allis, (E) inserção da sonda nasogástrica curta nº 10 equipada com o êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos; (F) administração de 20 mL de DMPBS; (G) a cada 4 seringas de 20 mL, o circuito era fechado com auxílio de uma pinça hemostática; (H) tubo de 50 mL para recuperação do líquido; (I) animal na posição quadrupedal após colheita</p> | 49 |
| <p>Figura 3. Percentual de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) exibindo estro de acordo com o protocolo hormonal utilizado (Protocolo Tradicional vs. Protocolo Dia 0)</p> | 52 |
| <p>Figura 4. Grau de qualidade de embriões produzidos <i>in vivo</i> a partir de ovelhas mestiças (Dorper e Santa Inês) de acordo com o protocolo hormonal utilizado (Protocolo Tradicional e Protocolo Dia 0)</p> | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Efeito de diferentes tratamentos de sincronização sobre o percentual de ovelhas em estro e prenhes (Fonte: Adaptado de Martemucci & D'Alessandro, 2010)..... | 25 |
| Tabela 2. Resposta ovulatória e viabilidade embrionária (média \pm e.p.), em diferentes estádios de desenvolvimento dos dois maiores folículos (F1 e F2), no momento das duas primeiras doses de pFSH do tratamento superovulatório administrado durante o anestro de ovelhas Rideau Arcott (Fonte: Adaptado de Bartlewski et al., 2008)..... | 26 |
| Tabela 3. Produção de embriões em caprinos tratados com o Protocolo Dia 0 ou o Protocolo Tradicional (Fonte: Adaptado de Menchaca et al., 2007)..... | 28 |
| Tabela 4. Protocolo Dia 0, com o início do tratamento com FSH no surgimento da onda 1, em comparação com o Protocolo Tradicional para superestimulação do ovário em ovelhas (Fonte: Adaptado de Menchaca et al., 2009)..... | 29 |
| Tabela 5. Efeito da repetição da colheita de embriões por laparotomia sobre a taxa de recuperação embrionária (Fonte: Adaptado de Torres & Sevellec, 1987; Andrioli et al., 1999)..... | 32 |
| Tabela 6. Quantidade de ovelhas que possibilitaram a transposição cervical com administração de PGF _{2α} ou PGE ₁ como agente dilatador cervical, bem como o tempo demandado para a execução desta técnica (Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2007)..... | 36 |
| Tabela 7. Estádios embrionários e suas respectivas características morfológicas (Fonte: Adaptado de Robertson & Nelson, 2010)..... | 37 |

| | |
|---|----|
| Tabela 8. Sobrevivência embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões ovinos da raça Santa Inês (Fonte: Adaptado de Oliveira, 2009)..... | 38 |
| Tabela 9. Qualidade embrionária e suas respectivas características (Fonte: Adaptado de Robertson & Nelson, 2010)..... | 39 |
| Tabela 10. Sobrevivência embrionária de acordo com a qualidade dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Fonte: Adaptado de Oliveira, 2009)..... | 40 |
| Tabela 11. Número de estruturas recuperadas, número total de embriões, de embriões transferíveis e congeláveis (média \pm e.p.), bem como taxas de fecundação, embriões transferíveis e congelabilidade de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês), de acordo com o tratamento hormonal utilizado (Protocolo Tradicional vs. Protocolo Dia 0)..... | 53 |
| Tabela 12. Graus de qualidade, Grau de Homogeneidade da massa embrionária, Grau de extrusão, de embriões produzidos <i>in vivo</i> a partir de ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês de acordo com o protocolo hormonal utilizado (Protocolo Tradicional vs. Protocolo Dia 0)..... | 54 |
| Tabela 13. Transposição da cérvix e colheita transcervical de embriões, sem e com administração de Misoprostol (PGE ₁) como agente dilatador cervical em ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) superovuladas com pFSH..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| BE | Benzoato de estradiol |
| 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) |
| eCG | Equine chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica equina) |
| EPV | Espaço perivitelínico |
| FPO | Folículos pré-ovulatórios |
| 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) |
| IA | Inseminação artificial |
| IETS | International Embryo Transfer Society (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões) |
| LH | Luteinizing hormone (hormônio luteinizante) |
| Mc | Mórula compacta |
| Mi | Mórula inicial |
| MOTE | Múltipla ovulação e transferência de embriões |
| P ₄ | Progesterona |
| PGE ₁ | Prostaglandina E ₁ |
| PGF _{2α} | Prostaglandina F _{2α} |

| | |
|---------|--|
| PBS | Phosphate buffered saline (solução salina fosfato-tamponada) |
| UNEB | Universidade do Estado da Bahia |
| UNIVASF | Universidade Federal do Vale do São Francisco |
| UI | Unidades internacionais |
| TE | Transferência de embriões |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 19 |
| 2. Revisão de literatura..... | 21 |
| 2.1. Morfofisiologia da reprodução em ovelhas..... | 21 |
| 2.2. Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE)..... | 22 |
| 2.2.1. Tratamentos hormonais..... | 23 |
| 2.2.2. Protocolos hormonais..... | 28 |
| 2.2.3 Fecundação..... | 30 |
| 2.2.4. Colheita de embriões..... | 30 |
| 2.2.4.1. Dilatadores cervicais..... | 35 |
| 2.2.5. Morfologia dos embriões..... | 36 |
| 3. Justificativa..... | 41 |
| 4. Objetivos..... | 43 |
| 4.1. Objetivo geral..... | 43 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 43 |
| 5. Material e métodos..... | 44 |
| 5.1. Ética animal..... | 44 |
| 5.2. Local de execução..... | 44 |
| 5.3. Animais experimentais..... | 44 |
| 5.4. Delineamento experimental..... | 45 |
| 5.5. Múltipla Ovulação e Transferência de embriões (MOTE)..... | 45 |
| 5.5.1. Tratamentos hormonais..... | 45 |
| 5.5.2. Avaliação da resposta ovulatória..... | 47 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5.5.3. Colheita de embriões..... | 48 |
| 5.5.4. Avaliação dos embriões..... | 50 |
| 5.6. Parâmetros avaliados..... | 51 |
| 5.7. Análise estatística..... | 51 |
| 6. Resultados..... | 52 |
| 7. Discussão..... | 57 |
| 8. Conclusões..... | 62 |
| 9. Referências bibliográficas..... | 63 |

1. INTRODUÇÃO

A diversidade de raças de ovinos no Brasil é um valioso recurso para o desenvolvimento da ovinocultura. Sistemas de cruzamentos utilizam-se da diversidade de raças para aumentar a produtividade, quando comparada aos rebanhos puros. Cézar (2004) aponta como alternativa a utilização da raça Dorper em cruzamentos planejados com ovelhas Santa Inês. Atrelada a uma melhor resposta produtiva do rebanho, vem à necessidade de se gerar uma tecnologia de produção em larga escala.

Neste sentido, as biotecnologias da reprodução despontam como ferramentas a auxiliar no aumento da produtividade do rebanho ovino do Nordeste do Brasil, destacando-se para esse fim, a Sincronização do Estro, a Inseminação Artificial (IA), bem como a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE).

A técnica de MOTE é um importante instrumento, uma vez que acelera e confere maior precisão ao processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002). Consiste em aumentar a produção embrionária através do aumento do número de oócitos liberados, após a administração de hormônios em uma fêmea geneticamente superior, realizar a fecundação dessas estruturas e transferir os embriões resultantes para o trato reprodutivo de fêmeas de baixo valor zootécnico, para completarem a gestação (OLIVEIRA & GONZALES, 1992).

Atualmente, sabe-se que resposta ovariana aos tratamentos superovulatórios está relacionada ao *status* folicular ovariano, no início do tratamento com o hormônio folículo estimulante (FSH). O Protocolo Dia 0 (Dia 0 = dia da ovulação) possui uma eficaz e fácil abordagem para iniciar o tratamento com FSH no início da emergência folicular, pois ele realiza uma pré-sincronização do estro, garantindo a ovulação e, por conseguinte, a emergência de pequenos folículos. Portanto, o Protocolo Dia 0 é iniciado, simultaneamente, com o surgimento de uma nova onda folicular, o que rende aceitáveis respostas superovulatórias (MENCHACA et al., 2007).

Outro fator importante nos programas de MOTE, em ovelhas, é o método de eleição para a colheita dos embriões. Possivelmente, a técnica de colheita de embriões mais em uso, em ovinos, ainda é o método cirúrgico ou laparotomia. Porém, visando minimizar os traumas e diminuir os custos decorrentes da técnica cirúrgica, além de assegurar a colheita de embriões em uma mesma doadora por várias vezes, procurou-se adaptar ao ovino, a técnica de colheita pela via

transcervical (ou seja, não-cirúrgica), na qual, geralmente, se utilizam fármacos que promovam a dilatação cervical, para facilitar a passagem do cateter de colheita. Os mais utilizados são: a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e o Misoprostol.

Com o uso do método transcervical de colheita de embriões, evitam-se grandes desvantagens que acompanham o método cirúrgico, como a necessidade da aquisição de equipamento de elevado custo e a formação de aderências do sistema genital das doadoras. Os métodos cirúrgico e semicirúrgico reduzem o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea e, em algumas vezes, comprometem a vida reprodutiva futura deste animal.

Dentro dessa perspectiva, este trabalho se propõe a utilizar o Protocolo Dia 0, buscando, dessa maneira, diminuir a alta variabilidade obtida na resposta ovulatória e aumentar a produção de embriões. Além disso, testar a viabilidade e aplicação do método de colheita transcervical com dilatadores, diminuindo, conseqüentemente, os traumas que são causados à doadora submetida à colheita cirúrgica e conferindo, desta maneira, um bem estar ao animal necessário para que este possua uma melhor e mais longa vida produtiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfofisiologia da reprodução em ovelhas

Conhecer a fisiologia reprodutiva da ovelha é de suma importância, para o uso das biotécnicas da reprodução e o conseqüente melhoramento genético. O termo fisiologia pode ser definido como um conjunto de complexos mecanismos e fenômenos que, através de linguagens bioquímicas, recebem comandos do sistema endócrino, promovendo a inter-relação dos órgãos.

De acordo com Fonseca (2005), as ovelhas são poliéstricas estacionais de dias curtos, sendo que a manifestação dos fenômenos reprodutivos é influenciada pelo fotoperíodo negativo, o qual tem seu efeito mais explícito na estação do outono. Contudo, conforme se aproxima da linha do equador, a ovelha é capaz de ciclar durante todo o ano, desde que bem alimentada, principalmente as raças deslanadas naturalizadas do Brasil. A nutrição compreende um importante fator para modular a resposta reprodutiva de ovelhas, como relatado por Salles et al. (2000), os quais observaram que fêmeas da raça Santa Inês com excesso de peso não possuem boa resposta a tratamentos superovulatórios.

Com relação ao ciclo estral da ovelha, o qual compreende o intervalo entre dois estros, ocorrem profundas transformações tanto ao nível hormonal e anatômico quanto no comportamento da fêmea. A duração deste período, em ovelhas, perdura por $17,0 \pm 2,0$ dias, sendo que possui como subdivisão, a fase folicular, com 4 dias de duração, e a luteal, completando os demais dias. Com o rompimento dos folículos pré-ovulatórios, ocorre a formação dos corpos lúteos (CL), os quais produzem crescentes níveis de Progesterona (P_4). A secreção de P_4 , durante esta fase, inibe a pulsatilidade do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) e o conseqüente pico do Hormônio Luteinizante (LH), regula o crescimento folicular e inibe a secreção de $PGF_{2\alpha}$ 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 de GnRH e LH. Em contrapartida, o Hormônio Foliculo Estimulante (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 (DUGGAVANTHI et al., 2003). De acordo com Jainudeen et al. (2004), a

ovulação da 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 no decorrer de 72 horas após, também tomando como referencial a ovulação. A ovelha possui gestação com duração de 150 dias, sendo que, por ser placenta dependente, a partir do 50° ao 70° dia, ocorre a regressão do corpo lúteo, deixando a placenta como fonte primária de P₄. Outra fase reprodutiva importante na ovelha é o puerpério, no qual ocorre involução uterina e restabelecimento da funcionalidade ovariana, sinais estes que são completos, 27 dias após o parto.(JAINUDEEN et al., 2004)

Dentro da fisiologia da ovelha, a dinâmica folicular também merece ressalva. Segundo Evans et al. (2000), o crescimento folicular na ovelha, se dá em padrão de ondas, tanto nas cíclicas quanto naquelas anestro. Para que isso ocorra, é necessária 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, como características mais freqüentes, pelo menos, um folículo com diâmetro ≥ 5 mm, por onda; o crescimento do maior folículo ocorrendo após 5-7 dias, com crescimento diário de 1 mm; à medida que a fase luteal avança, as concentrações de P₄ elevam-se, facilitando, assim, a emergência de novos folículos. Na maioria dos ciclos com duas ovulações, os folículos são provenientes da mesma onda ovulatória, porém, segundo Barrett et al. (2004), existem casos nos quais estes folículos originaram-se de ondas diferentes.

2.2. Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE)

O conhecimento da fisiologia da reprodução da fêmea ovina é essencial para a aplicação da Produção *In Vivo* de Embriões ou MOTE. Esta, por sua vez, se dá pela indução de múltiplas ovulações, realizada através de tratamentos hormonais administrados na fêmea doadora de embriões, a fim de obter vários folículos pré-ovulatórios, simultaneamente. Ao final do tratamento hormonal, à medida do surgimento do estro, as fêmeas doadoras são submetidas à monta natural ou inseminação artificial. Cinco a seis dias após a monta, os embriões são colhidos, geralmente, por laparotomia (NAQVI et al., 2002; SELVARAJU et al., 2003). Em

seguida, os embriões são transferidos para as receptoras de embriões, as quais gestarão as crias (BARCELOS et al., 2007).

A técnica de MOTE é um importante instrumento, uma vez que acelera e confere maior precisão ao processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002) e possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes, muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Assim, a MOTE possibilita o uso de fêmeas geneticamente superiores como doadoras de embriões, permitindo a multiplicação deste potencial, sendo uma importante ferramenta para acelerar e maximizar os processos (FONSECA et al., 2011). No entanto, um importante fator limitante ainda afeta o sucesso dos programas de MOTE: a variabilidade da resposta ovariana e da conseqüente produção de embriões (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004). Embora a resposta ovariana dependa do tratamento superovulatório utilizado, os fatores intrínsecos associados ao animal como raça, idade, individualidade, estágio de lactação, *status* ovariano, isto é, como número de folículos responsivos às gonadotrofinas no início de sua aplicação; e os fatores extrínsecos mais relacionados ao ambiente como nutrição, saúde e época do ano são responsáveis pela variabilidade das respostas à superovulação (COGNIÉ et al., 2003; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004).

Nesse contexto vários hormônios e protocolos ou tratamentos hormonais têm sido utilizados na tentativa de melhorar estes resultados.

2.2.1. Tratamentos hormonais

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, que está em estágio inicial de atresia, é "resgatado", em razão da estimulação hormonal, que tende a induzir a reativação dos mecanismos normais, culminando na esteroidogênese normal e também num 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).

Ainda no tocante à superovulação, pode-se obter um maior número de embriões. O mecanismo de indução da superovulação, em ovinos, parte dos

princípios básicos abordados e aplicados em bovinos. Com o intuito de atingir a superovulação, são utilizadas grandes doses de FSH ou de gonadotrofina coriônica equina (eCG), com o objetivo de aumentar o número de folículos ovulatórios, ovulações e embriões, podendo esta última ser extraída da pituitária de suínos (pFSH) ou ovinos (oFSH).

A eCG é administrada numa única dose (1000 a 2000 UI), por via intramuscular, 1 dia antes do fim do tratamento de sincronização do estro (COGNIÉ et al., 2003; FONSECA, 2005). Esta droga apresenta, como características positivas, a fácil aplicação, custo acessível, além de facilidade na obtenção. Todavia, em função de sua longa meia-vida, a eCG tem sido associada a baixas respostas, o que pode ser corrigido com a administração de anticorpos anti-eCG (MARTEMUCCI et al., 1995). Segundo Blanco et al. (2003), a ação prolongada da eCG pode resultar em uma alta incidência de folículos não ovulatórios, associados com elevados níveis de estradiol produzidos por estes folículos.

De acordo com D'Alessandro et al. (2005), o FSH é administrado em 6 a 8 doses decrescentes, intervaladas por 12 horas, durante 3 a 4 dias, iniciadas 2 ou 3 dias antes da remoção da esponja, sendo, atualmente, o principal hormônio utilizado em programas de superovulação. Técnicas que utilizam aplicações múltiplas de FSH são, atualmente, as mais utilizadas (COGNIÉ et al., 2003; FONSECA, 2005). As doses de pFSH variam em função da espécie (ovina ou caprina), estação, raça e peso corporal (COGNIÉ et al., 2003; CORDEIRO et al., 2003).

O FSH tem se mostrado superior à eCG, no tocante às taxas de ovulação, de fecundação e de produção de embriões de boa qualidade (COGNIÉ, 1999). Comparações quanto às eficácias da eCG e do FSH têm sido confrontadas, em razão das respostas superovulatórias em ovelhas, nas quais foi verificada uma taxa de ovulação média, significativamente, maior nas ovelhas que foram tratadas com pFSH do que com eCG (BLANCO et al., 2003). Tais autores ainda enfatizam que a incidência de grandes folículos que não ovularam foi, consideravelmente, superior nas fêmeas tratadas com eCG do que com FSH, enquanto que, com relação ao número de embriões transferíveis, os animais tratados com FSH passaram a apresentar valores superiores (BLANCO et al., 2003). Foi relatado ainda por BLANCO et al. (2003), um alto índice de múltiplos cistos foliculares nas doadoras de embriões submetidas a tratamentos superovulatórios com eCG, o que não se

observou nas fêmeas tratadas com FSH. Isso se deve, possivelmente, em razão da metabolização do FSH ser, consideravelmente, mais rápida do que a da eCG.

Um problema que, possivelmente, pode estar vinculado à superovulação de cabras, como também observado em ovelhas, é a regressão prematura de corpo lúteo (FONSECA, 2005). Esse problema é causa do retorno precoce ao estro, antes da época normal para a colheita embrionária, em que observam as taxas de recuperações embrionárias reduzidas, visto que esta característica parece estar associada com uma alteração no transporte embrionário através das tubas uterinas (TERVIT et al., 1985).

A elevada variabilidade na resposta superovulatória, notada principalmente em ovelhas, tende a prejudicar o processo de fecundação (ARMSTRONG & EVANS, 1983; HAWK et al., 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, como demonstrado na Tabela 1 (MARTEMUCCI & D'ALESSANDRO, 2010).

Tabela 1. Efeito de diferentes tratamentos de sincronização sobre o percentual de ovelhas em estro e prenhes (Fonte: Adaptado de Martemucci & D'Alessandro, 2010).

| Tratamento | Resposta estral (%) | Fertilidade (%) |
|---|---------------------|--------------------|
| BE (400) + PGF _{2α} (100) + BE (100) | 100 ^{Cc} | 0 |
| GnRH (3) PGF _{2α} (100) | 46,7 ^{Db} | 33,3 ^a |
| GnRH(3) + PGF _{2α} (100) + GnRH (3) | 33,3 ^B | 26,7 ^a |
| GnRH(3) + PGF _{2α} (100) + BE | 62,5 ^d | 12,5 ^{Bb} |

Valores com letras sobrescritas diferentes entre linhas indicam diferença significativa. ^{A, B}: P < 0,01; ^{a, b, c, d}: P < 0,05.

BE – Benzoato de estradiol; PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}; GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina.

Segundo Matemucci e D'Alessandro (2010), para reduzir os resultados negativos da superovulação, oriundos dos efeitos adversos dos fármacos utilizados nos tratamentos superovulatórios, tem-se buscado respostas em alguns protocolos de curto prazo, comparando-os com protocolos tradicionais de longo prazo.

A eCG mimetiza tanto as funções do LH quanto do FSH, funcionando principalmente como FSH (1FSH:4LH), o que leva a uma maior atividade metabólica das células da granulosa que, conseqüentemente, culminará em elevados níveis de estradiol plasmático, o qual altera o meio uterino, diminuindo a sobrevivência embrionária (Martemucci & D'Alessandro, 2010). De acordo com Bartlewski et al. (2008), os níveis de 17β -Estradiol, 12 horas após o início do tratamento com FSH são um forte indicativo da redução da qualidade embrionária, uma vez que ovelhas que se encontram com altas concentrações do respectivo esteróide, passam a apresentar uma percentagem, significativamente, baixa de embriões, pois o percentual de embriões em estágio de desenvolvimento, considerados “parados” ou em “regressão” é superior, quando comparada com as taxas de percentagens de embriões viáveis (Tabela 2). Esse fato pode ser justificado, possivelmente, pelo grande recrutamento de folículos antrais imaturos e a conseqüente ovulação de oócitos inviáveis, não devendo, entretanto, ser descartado o efeito nocivo direto dos altos níveis de 17β -Estradiol sobre o desenvolvimento de folículos e oócitos recrutados.

Tabela 2. Respostas ovulatórias e viabilidade embrionária (média \pm e.p.), em diferentes estádios de desenvolvimento dos dois maiores folículos (F1 e F2), no momento das duas primeiras doses de pFSH do tratamento superovulatório administrado durante o anestro de ovelhas Rideau Arcott (Fonte: Adaptado de Bartlewski et al., 2008).

| Variável | Estádio de desenvolvimento de F1 | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| | Crescendo (n = 9) | Parado (n = 8) | Regredindo (n = 7) | Parado ou Regredindo (n = 15) |
| N° de estruturas luteais | 8,5 a 3,4 | 12,9 \pm 5,5 | 9,2 \pm 3,6 | 10,9 \pm 3,2 |
| N° total de embriões recuperados | 2,3 \pm 1,0 | 5,5 \pm 2,0 | 4,4 \pm 2,7 | 4,9 \pm 1,7 |
| Taxa de recuperação (%) | 35,1 \pm 12,2 | 48,0 \pm 11,1 | 51,7 \pm 15,6 | 49,7 \pm 9,3 |
| N° de embriões (Graus 1 e 3) | 1,0 \pm 0,4 | 2,7 \pm 1,4 | 3,6 \pm 2,3 | 3,2 \pm 1,4 |

| | | | | |
|----------------------------------|--------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
| N° de embriões (Grau 4) | 1,3 ± 1,1 | 2,7 ± 1,6 | 0,9 ± 0,5 | 1,8 ± 0,8 |
| Taxa de viabilidade (%) | 66,7 ± 23,6 | 59,4 ± 16,9 | 73,5 ± 18,8 | 65,3 ± 12,2 |
| Estádio de desenvolvimento de F2 | | | | |
| Variável | Crescendo (n = 18) | | Parados ou Regredindo (n = 6) | |
| | | | | |
| N° de estruturas luteais | 9,7 ± 3,0 | | 12,0 ± 4,5 | |
| N° total de embriões recuperados | 3,8 ± 1,2 | | 5,7 ± 3,7 | |
| Taxa de recuperação (%) | 49,4 ± 9,0 | | 40,5 ± 16,1 | |
| N° de embriões (Graus 1 e 3) | 1,8 ± 0,8 | | 4,8 ± 3,3 | |
| N° de embriões (Grau 4) | 1,9 ± 0,9 | | 0,8 ± 0,5 | |
| Taxa de viabilidade (%) | 56,5 ± 14,3 | | 85,8 ± 6,7 | |

Somado a isso, Cognié et al. (2003) e Veiga-Lopez et al. (2006) afirmam que existe correlação negativa entre as concentrações de estradiol no momento inicial da aplicação de pFSH e a viabilidade embrionária, apresentando grande quantidade de embriões de Código 4, os quais são estruturas não transferíveis.

Algumas estratégias têm focado o início do tratamento superovulatório na emergência da onda folicular (na ausência de um folículo dominante), porém, 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 entre 0 e 30 embriões transferíveis (BALDASSARRE, 2008).

2.2.2. Protocolos hormonais

Com o intuito de melhorar a resposta ao tratamento superovulatório em pequenos ruminantes, protocolos que possibilitem conhecer a fase do ciclo estral em que se encontra a fêmea, têm sido desenvolvidos. Estes protocolos permitem iniciar o tratamento superovulatório no Dia 0 e fundamentam-se na aplicação da primeira dose de FSH, paralelamente à ocorrência de ovulação e emergência da primeira onda folicular. Com a utilização deste tipo de protocolo, pode-se reduzir a duração da permanência do dispositivo intravaginal de progesterona, minimizando os riscos de perdas e reduzindo também a incidência de vaginites (RUBIANES & MENCHACA, 2006).

O Protocolo Dia 0 (Dia 0 = dia da ovulação) possui uma eficaz e fácil abordagem para iniciar o tratamento com FSH no início da emergência folicular, pois ele realiza uma pré-sincronização do estro, garantindo a ovulação e, por conseguinte, a emergência de pequenos folículos. Portanto, o Protocolo Dia 0 é iniciado, simultaneamente, com o surgimento de uma nova onda folicular, o que rendem aceitáveis respostas superovulatórias.

Menchaca et al. (2007), trabalhando com cabras, observaram que o Protocolo Dia 0 aumentou os números de corpos lúteos (CL) e de embriões de Códigos 1 e 2, em comparação com o protocolo tradicional (Tabela 3), devido à ausência de um folículo ovariano grande (dominante). Estes resultados foram consistentes com estudos anteriores que demonstraram um efeito deletério do folículo dominante na resposta superovulatória em cabras (MENCHACA et al., 2002; GONZALEZ-BULNES et al., 2003), bem como em ovinos (RUBIANES et al., 1995; GONZALEZ-BULNES et al., 2002).

Tabela 3. Produção de embriões em caprinos tratados com o Protocolo Dia 0 ou o Protocolo Tradicional (Fonte: Adaptado de Menchaca et al., 2007).

| | Protocolo Dia 0 | Protocolo Tradicional | P |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------------|--------|
| Nº de oócitos e embriões | 6,7 ± 0,8 | 4,8 ± 0,6 | 0,09 |
| Nº de embriões / Nº de estruturas (%) | 95/114 (83) | 33/43 (77) | NS* |
| Nº de embriões transferíveis | 4,9 ± 0,7 | 2,6 ± 0,5 | 0,06 |
| Nº de embriões 1 e 2 | 4,8 ± 0,7 | 1,8 ± 0,5 | < 0,05 |

Nº de embriões 1 e 2 / Nº de estruturas (%) 81/114 (71) 16/43 (37) < 0,01

*Não significativo.

Em outro estudo (MENCHACA et al., 2009), onde foi utilizado o Protocolo Dia 0, em ovinos, também foram demonstrados resultados favoráveis, quando comparado ao Protocolo Tradicional de superovulação (Tabela 4).

Tabela 4. Protocolo Dia 0, com o início do tratamento com FSH no surgimento da onda 1, em comparação com o Protocolo Tradicional para superestimulação do ovário em ovelhas (Fonte: Adaptado de Menchaca et al., 2009).

| | Protocolo Tradicional (n=22) | Protocolo Dia 0 (n=22) |
|--|------------------------------|-----------------------------|
| Comportamento estral | | |
| % de doadoras em estro | 100,0 (22/22) ^a | 95,5 (21/22) ^a |
| Intervalo entre a remoção do CIDR e o início do estro (h) | 19,6 ± 1,3 ^a | 19,4 ± 1,3 ^a |
| Qualidade da resposta ovulatória | | |
| % de doadoras com regressão prematura de CL | 91,1 (2/22) ^a | 0,0 (0/22) ^a |
| % de doadoras com > 2 CL normais | 91,9 (20/22) ^a | 100,0 (22/22) ^a |
| Produção de embriões (Total de doadoras) | | |
| Nº de CL (média ± e.p.) | 10,1 ± 1,1 ^a | 13,5 ± 1,4 ^c |
| Nº de de oócitos e embriões (média ± e.p.) | 8,0 ± 0,8 ^a | 10,3 ± 1,2 ^b |
| Nº de embriões transferíveis (média ± e.p.) | 5,9 ± 1,1 ^a | 7,9 ± 1,4 ^b |
| Taxa de fecundação (%) | 82,4 (145/176) ^a | 84,1 (191/227) ^a |
| Taxa de embriões congeláveis (%) (Nº de embriões Graus 1 e 2 / Nº total de embriões) | 74,5 (108/145) ^a | 68,6 (131/191) ^a |

Letras diferentes dentro da linha indicam diferenças estatísticas significativas.

^{a, b} (P < 0,01); ^{a, c} (P < 0,05).

2.2.3. Fecundação

Para que as fêmeas doadoras de embriões sejam fecundadas com sucesso, é fundamental que haja um número viável de espermatozoides móveis dentro do trato genital da fêmea, no momento apropriado (BARIL et al., 1995). Outro fator importante é a simultaneidade entre os momentos das inseminações e ovulações. A redução na variabilidade do período em que as ovulações acontecem, assim como um acréscimo na taxa de ovulação podem decorrer do uso de GnRH em um momento fixo, após realizado um tratamento progestágeno (WALKER et al., 1989).

A monta natural e a Inseminação Artificial (IA) são técnicas que têm sido empregadas utilmente 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 et al., 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 IA. 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. 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 vir a ser sanado com a deposição de sêmen no lúmen uterino através de métodos cirúrgicos (TROUSON & MOORE, 1974) ou por inseminação laparoscópica em ovelhas superovuladas (EHLINGH et al., 2003).

2.2.4. Colheita de embriões

Outro fator importante nos programas de MOTE, em ovelhas, é o método de eleição para a colheita dos embriões. De modo geral, os métodos de colheita de embriões utilizados em ovinos são: o cirúrgico (laparotomia), semicirúrgico (laparoscopia) ou não cirúrgico (transcervical).

O método Cirúrgico ou Laparotomia é a técnica, usualmente, mais trabalhada em caprinos e ovinos (SELVARAJU et al., 2003). A técnica permite que os embriões

possam ser colhidos com sucesso tanto da tuba uterina quanto do útero. Entre cinco a seis dias após o início do estro, realiza-se a colheita uterina, fazendo-se necessário que as fêmeas estejam em jejum, cerca de 24 horas antes do ato cirúrgico. Imediatamente antes da colheita de embriões, se realiza a tricotomia e assepsia da região abdominal próxima ao úbere das doadoras, extraindo possíveis agentes estranhos que possam causar infecções na área da incisão, bem como é realizada a anestesia geral. A fêmea é disposta em decúbito dorsal, numa maca apropriada, com uma inclinação ântero-posterior de 30° a 45°. Posteriormente, é realizada a exteriorização dos ovários, onde será realizada a contagem dos corpos lúteos, o que possibilita a avaliação da eficácia do método Cirúrgico de colheita de embriões, através da obtenção da taxa de recuperação embrionária (OLIVEIRA & GONZALES, 1992). A lavagem, seja uterina ou tubária, é realizada com Solução Salina Fosfato-Tamponada (PBS), a 37°C. Para tal realização, introduz-se, então, um cateter na luz uterina, na base de cada corno uterino, que é obstruída, uma vez realizada compressão digital ou pelo uso de uma pinça atraumática. O tipo de cateter é considerado, por Pontes (1990), um dos aspectos mais significativos no recolhimento de embriões. O mais utilizado em pequenos ruminantes é o cateter de "Foley", possuindo duas vias, uma para insuflar o balão (cuff) de adaptação à luz do corno uterino, e a outra para recolher o meio. Geralmente, usam-se os cateteres de números 8, 10 e 12, com balão de 3 a 5 mL. É importante salientar que existe ainda, o cateter de 3 vias, sendo uma via para o ar, uma segunda para a injeção do meio de lavagem e uma terceira via para o recolhimento do líquido com os possíveis embriões. Para injetar a solução de lavagem, uma seringa, acoplada a uma agulha, é introduzida na luz uterina, próximo à junção útero-tubária, por onde 30 a 40 mL de PBS, a 37° C, são injetados. O lavado é colhido em placas plásticas de Petri ou em tubos Falcon, sendo avaliado em estéreomicroscópio de luz fria, sob um aumento mínimo de 70 vezes.

Em pequenos ruminantes, a colheita cirúrgica é o método mais eficiente, em virtude das altas taxas de recuperação, variando de 70% a 90%, como afirmaram Baril et al. (1995). À medida que os embriões são colhidos do útero pelo método citado acima, torna-se possível verificar o percentual de recuperação embrionária entre 80% e 94%, respectivamente, em cabras nativas da África do Sul e Boer (GREYLING et al., 2002).

Quando exteriorizado o trato reprodutivo da fêmea por laparotomia, no intuito de obter embriões, podem ser gerados traumas cirúrgicos, podendo levar à formação de aderências pós-operatórias, as quais podem comprometer útero e ovário, sendo, portanto, um fator limitante nos procedimentos de laparotomia e laparoscopia (ANDRIOLI et al., 1999).

Principalmente a colheita Cirúrgica de embriões, realizada, sucessivamente, na mesma fêmea doadora, influencia negativamente a taxa de recuperação de embriões. Todavia, pode se reduzir os efeitos negativos deste método de colheita embrionária através da aspersão do útero e dos ovários com soro fisiológico heparinizado (50 UI de heparina sódica/mL) ou com solução de Dextran 70 g, a 6,0%. A sutura, por sua vez, pode ser realizada com um padrão simples interrompido com fio de poliglactina 2-0 (ISHWAR & MEMON, 1996). Santana (1994) mencionou que esta técnica é a que provoca um menor índice de trauma, levando, conseqüentemente, a um menor grau de aderências ao nível de ovários e tubas uterinas. Conforme Baril et al. (1995), essa é a técnica mais apreciada, tornando-se a mais utilizada para a colheita embrionária em cabras. A taxa de estruturas recuperadas é cerca de 70 a 90%. Entretanto, nas doadoras permanentes, nas quais a colheita é repetida, o surgimento de aderências do útero, tubas uterinas e ovários tem, por conseqüência negativa, a redução da taxa de recuperação de embriões.

A Tabela 5 ressalta como a ordem de colheitas embrionárias afeta diretamente a recuperação de embriões nas fêmeas de pequenos ruminantes domésticos, principalmente, na da espécie ovina.

Tabela 5. Efeito da repetição da colheita de embriões por laparotomia sobre a taxa de recuperação embrionária (Fonte: Adaptado de Torres & Sevellec, 1987; Andrioli et al., 1999).

| Espécie | Ordem de colheita | | | Fonte |
|---------|-------------------|------------|------------|----------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| Ovina | 88,0%(18) | 52,0% (17) | 24,0% (15) | Torres & Sevellec, 1987 |
| Caprina | 85,0% (10) | 85,7% (10) | 78,2% (9) | Andrioli et al., 1999 |

Na tabela supracitada, pode se observar uma redução de 64% da primeira até a terceira colheita, em ovelhas. Fato este que não é observado com tanta relevância em cabras, como afirma o trabalho realizado por Andrioli et al. (1999), no qual relataram um decréscimo de apenas 6,8% nas três colheitas.

Cordeiro (1997) fez menção ao método semi-cirúrgico ou laparoscopia, como o método que apresenta, como principal vantagem, a redução de traumatismos da fêmea doadora, quando comparado ao método Cirúrgico. No entanto, este método apresenta restrições ao seu uso, uma vez que necessita, para a sua execução, de qualificação especializada por parte dos técnicos, bem como maior implantação tecnológica.

Durante um período de 24 horas antes da colheita de embriões, os animais ficam em jejum hídrico-alimentar, recebendo, posteriormente, anestesia geral. Em uma mesa apropriada, o animal passa a ser contido com a cabeça para baixo. Essa técnica consiste na inserção de um trocáter (7 mm de diâmetro) na cavidade abdominal para a passagem de um endoscópio rígido, para que os órgãos genitais possam ser melhor visualizados. Outros dois trocáteres são, ainda, introduzidos próximo ao primeiro, para a passagem de uma pinça de manipulação e de fixação dos cornos uterinos, bem como de um cateter de Foley para o recolhimento do meio, o qual é introduzido por um cateter endovenoso, inserido próximo à junção útero-tubárica (OLIVEIRA & GONZALES, 1992).

Os índices de recuperação podem ser melhorados, uma vez que se utiliza um cateter rígido de três vias, para introdução e recolhimento do meio, como afirmaram Oliveira & Gonzales (1992). Os autores ainda deram continuidade, relatando que, em cabras submetidas a uma primeira colheita, a taxa de recuperação por laparoscopia era inferior (entre 10 e 15%), quando comparada àquela obtida por laparotomia. Todavia, em cabras doadoras permanentes, essas taxas foram reduzidas, apesar da repetição das colheitas, sendo que, para estas fêmeas, é recomendada a utilização da colheita de embriões sob controle do endoscópio, como afirmaram Baril et al. (1995). Oliveira & Gonzales (1992) passaram a enfatizar que esta técnica apresenta, como vantagens, a ausência de aderências, redução de stress e a possibilidade do uso de fêmeas geneticamente superiores por várias vezes, sem traumas cirúrgicos. O elevado custo do aparelho de laparoscopia e a necessidade de uma equipe com treinamento especializado são entraves que restringem a utilização desta técnica nas instituições.

Visando minimizar os traumas e diminuir os custos, decorrentes das técnicas cirúrgica e semi-cirúrgica, além de assegurar a colheita de embriões em uma mesma doadora por várias vezes, procurou-se adaptar ao ovino, a técnica de colheita pela via transcervical. Dessa maneira, evitam-se grandes desvantagens que acompanham o método cirúrgico, como a necessidade da aquisição de equipamento de elevado custo, e a formação de aderências do sistema genital das doadoras, reduzindo o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea e, em algumas vezes, comprometendo a vida reprodutiva futura deste animal (HOLTZ, 2000; SILVA et al., 2001; 2004). Assim, a colheita transcervical de embriões é uma alternativa para os métodos cirúrgico e semi-cirúrgico, sendo bastante utilizada e com sucesso em vacas, pois combina fácil execução, baixo índice de aderências e boa taxa de recuperação (ANDRIOLI et al., 1999). Entretanto, um dos fatores que limitam a sua utilização, em ovinos, é a dificuldade de transpor o canal cervical, já que este é longo, sinuoso e de diâmetro reduzido (HALBERT et al., 1990), apresentando anéis que se dispõem excentricamente e lhe conferem uma forma complicada de acesso (SILVA et al., 2004) nesta espécie, restringindo a passagem do cateter (OLIVEIRA & GONZALES, 1992).

Silva et al. (2005) relataram que o procedimento de colheita transcervical, em ovelhas, pode ser executado com o animal em estação e não em decúbito dorsal, como no método cirúrgico. Para a realização da técnica transcervical de colheita de embriões, os animais devem estar contidos adequadamente em brete apropriado, levemente sedados, minimizando, assim, o seu desconforto, facilitando o processo de colheita (FONSECA et al., 2005). Em seguida, a assepsia da região perineal deve ser feita, com água limpa e detergente, bem como a tricotomia do pelo ou lã da região da base da cauda da fêmea, não sendo, todavia, necessário utilizar soluções à base de álcool nestas superfícies (FONSECA et al., 2011).

A anestesia é feita pela via epidural na região sacrococcígea, utilizando lidocaína 2% (GUSMÃO et al., 2007). Após esses procedimentos, introduz um espelho vaginal “bico de pato”, lubrificado, com fonte luminosa, para visualização e localização do óstio cervical caudal, cujas bordas são fixadas e tracionadas com o auxílio de duas pinças Allis. Souza et al. (1994) também descreveram a tração cervical como um passo fundamental para a transposição da cérvix na espécie ovina. Em seguida, introduz-se uma sonda de três vias, guiada por um cateter de aço inoxidável, direcionada a um dos cornos uterinos, infla-se o balão do cateter,

com 3 cm³ de ar, administra-se 20 mL de PBS, em doses, significativamente, pequenas, readquirindo-as em um tubo coletor graduado, sob o sistema de vácuo e leva-se ao estereomicroscópio para identificar e avaliar os embriões. Após a colheita, administra-se 5 mL de solução antisséptica na vagina, visando prevenir possíveis infecções decorrentes dos traumatismos causados pelas pinças de Allis sobre os tecidos cervical e vaginal (CORDEIRO, 1997).

2.2.4.1. Dilatadores cervicais

O uso da técnica transcervical de colheita de embriões reúne melhores taxas de recuperação embrionária ou a maximização do uso de doadoras de embriões em colheitas sucessivas, necessitando geralmente, utilizar fármacos que promovam a dilatação cervical para facilitar a passagem do cateter pela cérvix durante o procedimento de colheita. Com esse intuito, pesquisadores têm testado vários tipos de medicamentos com o objetivo de promover o relaxamento cervical e viabilizar a colheita de embriões e a IA através do canal cervical, em ovelhas. Os mais utilizados são: a Prostaglandina F_{2α} (PgF_{2α}) e seus análogos, além do Misoprostol, os quais têm, como objetivo, provocar uma dilatação cervical, a fim de viabilizar a colheita transcervical. Silva et al. (2004) verificaram que a aplicação de 200 µg de Misoprostol, três a cinco horas antes da colheita de embriões, no fundo de saco vaginal das ovelhas, facilitou a passagem do cateter.

Outras drogas também foram utilizadas, como uma combinação de PGE₂ associada ao estradiol (BARRY et al., 1990; McKELVEY et al., 1997), à ocitocina (SAYRE & LEWIS, 1996), à ocitocina com estradiol (FLOHR et al., 1999; WULSTER-RADCLIFFE et al., 1999), à PGF_{2α} (SOUSA, 1999), à interleucina humana (CROY et al., 1999), ao cloridrato de bromexina (ALMEIDA et al., 2002), à PGE₁ e ao estradiol (OLIVEIRA, 1992; ISHWAR & MEMON, 1996), onde verificou-se a não interferência dessas drogas na qualidade e viabilidade dos embriões, obtendo-se passagens transcervicais que variaram de 33,0% a 100,0% das ovelhas.

Gusmão et al. (2009), utilizando a administração de Misoprostol, análogo sintético da Prostaglandina E₁ (PGE₁), no fundo do saco vaginal, cinco horas antes da colheita de embriões, alcançaram 94,83% de taxa de sucesso na transposição do canal cervical, em ovelhas da raça Dorper, sendo superior aos descritos por McKelvey et al. (1997), que utilizaram PGE₂ e estradiol, por quatro dias, conseguindo 33,0% de eficiência na transposição do canal cervical de ovelhas

Suffolk, superando também os resultados encontrados por Croy et al. (1999), que fizeram uso da interleucina humana e só alcançaram transposição cervical parcial das fêmeas tratadas.

Gusmão et al. (2007) obtiveram 59% de permeabilidade da cérvix, em ovelhas da raça Santa Inês e utilizando o Cloprostenol (análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$), 63%, usando com Misoprostol (análogo da PGE_1), e nenhuma passagem nos animais do grupo que não utilizou qualquer fármaco para dilatar a cérvix (Tabela 6). Assim, foi demonstrado que a utilização da $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou da PGE_1 como agentes dilatadores, possibilita uma transposição da cérvix, sem interferir de maneira negativa na produção e qualidade dos embriões. Este relato também foi comprovado por Van Niekerk et al. (1990) e Pereira et al. (1998), os quais, utilizando Prostaglandinas (E_1 , E_2 e $\text{F}_{2\alpha}$), isoladamente ou associada ao Cipionato de Estradiol, algumas horas antes da colheita, constataram o aumento da permeabilidade cervical ao cateter ou à sonda de colheita, não afetando a viabilidade embrionária.

Tabela 6. Quantidade de ovelhas que possibilitaram a transposição cervical com administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou PGE_1 como agente dilatador cervical, bem como o tempo demandado para a execução desta técnica (Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2007).

| | $\text{PGF}_{2\alpha}$ | PGE_1 | Sem Dilatador |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| Nº de animais tratados | 17 | 19 | 13 |
| Nº de animais colhidos | 10 ^a | 12 ^a | 0 ^b |
| Tempo de execução (min) | 27,30 ± 7,65 ^a | 32,75 ± 9,83 ^a | - |

^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

2.2.5. Morfologia dos embriões

Com relação às características morfológicas dos embriões, estas são avaliadas quanto à forma, embora não sejam avaliadas quanto a sua viabilidade. Essa classificação embrionária foi proposta pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a qual dividiu, morfológicamente, em nove categorias (Tabela 7).

Tabela 7. Estádios embrionários e suas respectivas características morfológicas (Fonte: Adaptado de Robertson & Nelson, 2010).

| Estádio embrionário | Características |
|-----------------------------|---|
| 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. |
|---------------------------|---|

De acordo com Oliveira (2009), o estágio do desenvolvimento embrionário é de fundamental importância para a classificação dos embriões para posterior transferência. Relata também que as taxas de sobrevivência embrionária de mórulas foi menor que de blastocistos (Tabela 8). Os achados do mencionado autor, quanto à correlação entre a sobrevivência embrionária e o estágio dos embriões, corroboram com os resultados encontrados por Bari et al. (2003), os quais compararam mórulas e blastocistos. Estes resultados obtidos estão de acordo com aqueles de alguns estudos em vacas, ovelhas e porcas (POPE et al., 1986; COLEMAN et al., 1987; BREUEL et al., 1991). Contudo, tais dados contrastam com aqueles que indicam uma alta taxa de sobrevivência das mórulas, quando comparada àquela obtida a partir de blastocistos (HASLER et al., 1980; ARMSTRONG & EVANS, 1983; DONALDSON, 1985).

Tabela 8. Sobrevivência embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões ovinos da raça Santa Inês (Fonte: Adaptado de Oliveira, 2009).

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

*Nº de crias / Nº de embriões transferidos

Os embriões ainda são avaliados quanto a caracteres individualizados, 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 9).

Tabela 9. Qualidade embrionária e suas respectivas características (Fonte: Adaptado de Robertson & Nelson, 2010).

| Qualidade embrionária | Características |
|----------------------------------|--|
| Código 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. |
| Código 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. |
| Código 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. |
| Código 4: Morto ou degenerado | Embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis. |

Bari et al. (2003) relatam que embriões de Códigos 3 e 4 toleram melhor a assincronia dos estros entre doadora e receptora do que os embriões de Códigos 1 e 2, bem como que as mórulas iniciais toleram melhor esta assincronia do que os outros estádios. Bari et al. (2003) relatam também que não houve diferença na taxa de sobrevivência entre embriões de Códigos 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 Código 3 tiveram uma menor taxa de sobrevivência (61,4%), comparado aos embriões de Códigos 1 e 2, com uma redução mais notável na taxa de sobrevivência dos embriões de Código 4 (37,5%), embora deva-se notar que o número de embriões de Código 4 transferidos foi,

relativamente, menor. Segundo Bari et al. (2003), devido a 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. Pesquisando sobre este assunto, Oliveira (2009) observou que os embriões de Código 1 resultaram em melhores percentuais de sobrevivência, quando comparados aos de Código 2, como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10. Sobrevivência embrionária de acordo com a qualidade dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Fonte: Adaptado de Oliveira, 2009).

| Qualidade embrionária | Sobrevivência embrionária(%) |
|-----------------------|------------------------------|
| Código 1 | 30,5 (18/59)* |
| Código 2 | 29,0 (9/31)* |
| Total | 31,1 (28/90)* |

*Nº de crias / Nº de embriões transferidos

Dentro dessa perspectiva, este trabalho se propõe a utilizar o Protocolo Dia 0, buscando, dessa maneira, diminuir a alta variabilidade obtida na resposta ovulatória e aumentar a produção de embriões. Além disso, testar a viabilidade e aplicação do método de colheita transcervical com dilatadores, diminuindo, conseqüentemente, os traumas que são causados à doadora submetida à colheita cirúrgica e conferindo, desta maneira, um bem estar ao animal necessário para que este possua uma melhor e mais longa vida produtiva.

3. JUSTIFICATIVA

A técnica de MOTE contribui substancialmente para o melhoramento genético dos ovinos em diversos países em todo o mundo. Apesar de vários estudos nessa área, a grande variabilidade encontrada nas respostas ovarianas de ovelhas ainda é um fator limitante para o desenvolvimento desta biotécnica. Atualmente, mesmo com os conhecimentos sobre a dinâmica folicular em ovelhas e a produção de hormônios com qualidade e pureza, não se tem um protocolo que seja capaz de fornecer uniformidade nas respostas superovulatórias, sendo este, um motivo que desperta bastante interesse por parte de muitos grupos de pesquisa, por se tratar de um elo muito importante para o sucesso geral desta biotécnica.

A alta variabilidade encontrada é um ponto crítico dos programas de MOTE, e esta resposta ovariana é dependente de fatores endógenos (genética, plano nutricional, status folicular, estação do ano) e exógenos (tipo, dose e protocolo de aplicação da gonadotrofina utilizada, método de inseminação e intervalo entre tratamentos). Com relação aos hormônios utilizados, o FSH, é o de eleição, quando comparado a eCG. Pois, em vários estudos foi demonstrado a eficiência do FSH em promover melhores taxas de superovulação e fecundação.

Outro fator que merece destaque, é o “status” ovariano no início do tratamento superovulatório, onde foi observado através de exames ultrassonográficos e endoscópicos em ovelha cíclicas, que este pode interferir nos resultados da MOTE. Foi observado um incremento na resposta superovulatória, quando o tratamento hormonal é iniciado na emergência de uma onda de desenvolvimento folicular ou na ausência de um folículo dominante.

Diante disto, torna-se clara a importância da contribuição que pode ser gerada pelo uso do Protocolo “Dia 0”, pois este realiza uma pré-sincronização do estro, garantindo a ovulação e, por conseguinte, a emergência de pequenos folículos, iniciando, portanto, o tratamento com FSH no início da emergência folicular.

Além disso, na ovelha, o principal fator que limitava a utilização da TE em escala comercial, sempre foi a dificuldade de serem realizadas colheitas pelo método transcervical, devido a barreira anatômica de transposição do canal cervical, já que este é longo, sinuoso, com abertura dos anéis de forma excêntrica e com diâmetro reduzido. Este fato tornava o método cirúrgico e o laparoscópico, as únicas opções de colheita. Estas técnicas apresentam como grandes desvantagens a

necessidade da aquisição de equipamento de elevado custo, e a formação de aderências do sistema genital das doadoras, reduzindo o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea e, em algumas vezes, até comprometendo a vida reprodutiva futura deste animal. Recentemente, foi possível superar esta grande barreira, tornando a colheita transcervical uma rotina em muitos laboratórios. Geralmente, se utilizam fármacos que promovam a dilatação cervical, para facilitar a passagem do cateter. Dentre os fármacos utilizados o Misoprostol, o qual é colocado no fundo de saco vaginal das ovelhas, três a seis horas antes da colheita, facilitando a passagem do cateter.

No entanto, o sucesso da transposição da barreira cervical parece depender de vários fatores, como a raça, o número de partos ocorridos anteriormente à colheita, bem como de fatores inerentes ao indivíduo, por isso, foi testado se o uso do Misoprostol é capaz de melhorar a passagem cervical, mesmo em animais mestiços que possuem um histórico de, no mínimo, dois partos.

Diante do exposto, torna-se necessário a tentativa de substituição do método cirúrgico pelo transcervical para recuperação de embriões produzidos *in vivo* em ovelhas. Visto que a colheita transcervical é um procedimento simples, que consome pouco tempo e possibilita ser repetido sucessivas vezes com poucos risco ao animal, comparado com a técnica cirúrgica. Além disso, a colheita transcervical torna os programas de MOTE mais práticos, por dispensar o uso de equipamentos especializados e o emprego de anestesia geral nos animais. Proporcionando assim, além de praticidade, um bem estar animal necessário para as doadoras de embriões ovinos.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo Geral*

- Avaliar o efeito do protocolo Dia 0 e do dilatador cervical Misoprostol na produção de embriões de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) do submédio São Francisco.

4.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito do protocolo Dia 0 na produção *in vivo* de embriões em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês quanto à (ao):
 - Percentual de doadoras de embriões em estro;
 - Percentual de ovelhas ovulando;
 - Percentual de doadoras de embriões superovulando;
 - Taxa de ovulação;
 - Taxa de fecundação;
 - Qualidade embrionária;

- Avaliar o efeito do Misoprostol, como dilatador cervical, na produção *in vivo* de embriões em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês quanto à (ao):
 - Quantidade de cérvices ultrapassadas;
 - Tempo de passagem da sonda de colheita de embriões;
 - Tempo de execução da colheita transcervical de embriões;
 - Quantidade de meio recuperado pós-colheita transcervical de embriões;
 - Taxa de recuperação embrionária.

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), sob o Protocolo nº 0005/160512.

5.2. *Local de execução*

O experimento foi realizado na Universidade do Estado da Bahia (UNEB), no Setor de Produção Animal, localizado em Juazeiro-BA. O município está localizado a 9° 24' 42" S e 40° 29' 55" O, numa altitude de 368 m e com temperatura média anual de 26°C. A pluviosidade média anual registrada em Juazeiro é de 535,5 mm, a qual é distribuída no período de fevereiro a abril (EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2009).

5.3. *Animais experimentais*

Foram utilizadas, como doadoras de embriões, 24 ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês), nunca tratadas anteriormente com hormônios, selecionadas após ultrassonografia, evitando assim, que algum animal prenhe, bem como portador de alguma patologia genital, fizesse parte do experimento. Para tanto, foi utilizado um equipamento de ultrassonografia modo-B (CHISON[®] 8100/8300 VET, Brasil), equipado com um transdutor transretal linear de 6 a 8 MHz de frequência. O transdutor foi acoplado a um bastão plástico e atraumático, o qual permitiu a manipulação da probe, externamente ao reto. Para o exame e com cada doadora disposta em estação, a ampola retal foi esvaziada manualmente, seguida da injeção retal de 20 mL de gel para ultrassonografia (Plurigel[®], Carbogel, Brasil). Em seguida, a probe foi inserida transretalmente e girada nos sentidos horário e anti-horário para a visualização dos órgãos reprodutivos. Foram, ainda, utilizados dois carneiros Dorper, como reprodutores, de fertilidade comprovada e um carneiro da raça Santa Inês como rufião.

As matrizes foram submetidas a um regime semi-intensivo de produção. Durante o dia, as ovelhas eram manejadas em área de capim Tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) das 7:00 horas às 17:00 horas, obedecendo uma lotação que assegurava a disponibilidade de 10 kg de matéria seca para cada 100 kg de

peso vivo, pernoitando em aprisco coberto, com lotação de 2 m²/animal, em 4 diferentes compartimentos, de acordo com o tratamento experimental. Os animais tiveram, ainda, livre acesso à água no pasto e no aprisco, bem como a uma suplementação mineral para ovinos (OVINOFÓS[®], Tortuga, Brasil), acrescido de uma mistura de compostos nitrogenados não proteicos (9 partes de uréia para uma parte de sulfato de amônio) na proporção de 10%, o que lhes garantiu os requerimentos energéticos e protéicos para estação sexual ou fase inicial da gestação (NRC, 1985). Os reprodutores permaneceram, durante o dia e a noite, em aprisco coberto, recebendo dieta de capim de corte Napier, picado à vontade, além de uma mistura de alimentos concentrados (60% de farelo de milho, 20% de farelo de trigo e 20% de farelo de soja), na quantidade de 1,0-1,5 kg/animal/dia, em duas refeições. Da mesma forma que nas fêmeas, água e sal mineral foram fornecidos à vontade e também lhes foram garantidos os requerimentos energéticos e protéicos para animais em estação sexual (NRC, 2007). O manejo sanitário foi baseado no controle anti-helmíntico de todos os animais, uma semana antes do início dos protocolos experimentais, utilizando-se o produto a base de Moxidectina à 1% (Cydectin[®], FORT DODGE, Brasil), na dosagem de 1 mL para cada 50 kg de peso, aplicada por via sub cutânea.

5.4. Delineamento experimental

O experimento foi dividido em duas etapas distintas. No Experimento 1, as 24 ovelhas foram distribuídas ao acaso em dois grupos experimentais: Protocolo Tradicional e Protocolo Dia 0, ambos contendo 12 ovelhas.

Já no Experimento 2, as mesmas 24 ovelhas foram redistribuídas equitativamente em dois novos grupos experimentais, previamente ao momento da colheita transcervical de embriões: Controle e Misoprostol.

5.5. Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE)

Experimento 1

5.5.1. Tratamentos hormonais

Com relação às doadoras submetidas ao protocolo Tradicional (n = 12), estas receberam, por via intravaginal, um dispositivo liberador de progesterona (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), o qual permaneceu na porção cranial da vagina por 14 dias. O tratamento superovulatório com pFSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá) foi iniciado, 60 horas antes do final do tratamento com progesterona, a partir de quando as doadoras receberam, por via intramuscular, 240 mg de pFSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá), divididas em oito doses decrescentes (50/50; 36/36; 24/24; 10/10 mg), em intervalos de 12 horas. Concomitante com a primeira aplicação de pFSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá), também foram administradas, por via intramuscular, 160 µg de um análogo da PGF_{2α} (Cloprostenol) (Ciosin[®], Schering-Plough, Brasil), além de uma aplicação de 8,4 µg do análogo de GnRH (Acetato de Buserelina) (Sincrofort[®], Ourofino, Brasil), 24 h após a remoção do CIDR (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil). Decorridas 12 horas da retirada do CIDR (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), iniciou-se a detecção do estro das doadoras de embriões. Para isto, foi utilizado um carneiro Santa Inês, o qual ficou exposto às fêmeas por, no mínimo, 30 minutos, a intervalos de quatro horas, até a última delas, apresentar estro. A ovelha foi considerada em estro, quando se manteve imóvel à tentativa de monta feita pelo macho (MAULÉON & DAUZIER, 1965). Após confirmação de estro, as fêmeas foram submetidas à monta natural, no momento do surgimento do estro e 24 horas depois, por um macho ovino da raça Dorper, de fertilidade previamente comprovada.

Já nas doadoras que foram submetidas ao protocolo Dia 0 (n = 12), foi realizada, inicialmente, a sincronização do estro e das ovulações, utilizando para isto, o protocolo Curto (MENCHACA et al., 2007) de sincronização do estro. Este consiste na inserção intravaginal de um dispositivo liberador de progesterona (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), o qual permaneceu na porção cranial da vagina por seis dias. Foram administrados, por via intramuscular, 160 µg de um análogo da PGF_{2α} (Cloprostenol) (Ciosin[®], Schering-Plough, Brasil), no momento da inserção do CIDR (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), para promover a luteólise e, no momento da retirada do CIDR, foram administradas 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) (Novormon[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil), para sincronizar a ovulação. Uma dose de 8,4 µg de um análogo do GnRH (Acetato de Buserelina) (Sincrofort[®], Ourofino, Brasil), foi dada, 36 horas após a remoção do CIDR (EASI-BREED CIDR[®],

Pfizer, Brasil) para garantir a ovulação (PIERSON et al., 2003). O comportamento estral foi detectado como descrito para os animais do protocolo Tradicional, porém durante as 84 horas após a remoção do CIDR.

Para confirmar o momento exato da ovulação, foram realizados dois exames de ultrassonografia transretal, sendo um no momento da administração do análogo de GnRH (Acetato de Buserelina) (Sincrofort[®], Ourofino, Brasil) e outro no início do tratamento superovulatório com pFSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá). Para tanto, foi utilizado o mesmo equipamento de ultrassonografia e o mesmo procedimento, já descrito anteriormente. A ocorrência da ovulação foi confirmada pela identificação do maior folículo ovariano na primeira avaliação ultrassonográfica e do seu desaparecimento no exame de ultrassonografia seguinte (GINTHER et al., 1995).

A primeira dose de pFSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá) foi, então, administrada, 84 horas após a remoção do CIDR (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), sendo dividida em oito doses decrescentes (50/50; 36/36; 24/24; 10/10 mg), em intervalos de 12 horas. Duas doses de 80 µg do análogo da PGF_{2α} (Cloprostenol) (Ciosin[®], Schering-Plough, Brasil) foram administradas simultaneamente com as duas últimas aplicações de pFSH. Reiniciou-se a detecção do estro das doadoras de embriões juntamente com a aplicação da última dose de pFSH. Para isto, foi utilizado um carneiro da raça Santa Inês, o qual ficou exposto às fêmeas por, no mínimo, 30 minutos, a intervalos de quatro horas, até a última delas, apresentar estro. A ovelha foi considerada em estro, quando se manteve imóvel à tentativa de monta feita pelo macho (MAULÉON & DAUZIER, 1965). Após confirmação de estro, as fêmeas foram submetidas à monta natural, no momento do surgimento do estro e 24 horas depois, por um macho ovino da raça Dorper, de fertilidade previamente comprovada.

Para sincronizar o pico de LH e a ovulação foram administrados 8,4 µg do análogo de GnRH (Acetato de Buserelina) (Sincrofort[®], Ourofino, Brasil), 24 horas após a primeira aplicação do Cloprostenol (Ciosin[®], Schering-Plough, Brasil), como descrito acima, no final do tratamento superovulatório.

5.5.2. Avaliação da resposta ovulatória

No quinto dia após a primeira monta, as doadoras foram submetidas a um jejum hídrico e alimentar de 12 e 24 horas, respectivamente. E, seis dias após a

primeira monta e, imediatamente antes da colheita de embriões, a fim de verificar a resposta ovulatória, as ovelhas foram submetidas a uma laparoscopia para visualizar a resposta ovulatória, conforme descrito por Oldham & Lindsay (1980), respeitando a ordem de aparecimento de estro.

Experimento 2

5.5.3. Colheita de embriões

Para a realização das colheitas de embriões, todos os animais foram submetidos à colheita Transcervical de embriões, sendo as doadoras redistribuídas em dois subgrupos. No primeiro grupo (Grupo Controle), as ovelhas receberam no fundo de saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, 5 mL de solução fisiológica a 0,9% NaCl (Fisiológico 0,9%[®], EquiPLEX, Brasil), 6 horas antes da colheita Transcervical de embriões. No segundo grupo (Grupo Misoprostol), foi administrado, no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, um análogo da PGE1, o Misoprostol (Prostokos[®], Hebron, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda., Brasil), 6 h antes da colheita. Para tanto, foi utilizada uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial. O Misoprostol foi administrado na dose de 200 µg/ovelha, onde 1 comprimido de 200 µg foi macerado, previamente, diluído em 5 mL de solução fisiológica (Figura 1).

Para a colheita Transcervical de embriões, foi realizado o bloqueio anestésico nas doadoras, pela administração de 5 mL/animal de Cloridrato de Lidocaína 2% sem vasoconstritor (Lidovet[®], Bravet, Brasil), pela via epidural, na região sacrococcígea. Foi, então, inserido um espéculo de Collins vaginal lubrificado, com auxílio de uma fonte luminosa de cabeça, para visualização e localização da cérvix. Com o auxílio de duas pinças Allis (26 cm), foi feito o pinçamento das bordas do óstio cervical caudal e seu tracionamento em direção ao vestíbulo da vagina. Uma sonda nasogástrica curta nº 10 (Sonda Naso, Embramed[®], Brasil), equipada com o êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos (Aplicador Universal Nacional[®], Alta Genetics, Brasil), foi usada para transpor os anéis cervicais.

Figura 1. (A) 1 comprimido de 200 µg de Misoprostol, (B) maceração do comprimido, (C) diluição do comprimido em 5 mL de solução fisiológica e (D) administração no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, com auxílio de uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial.



Foi conectada uma seringa de 20 mL à sonda para inserir DMPBS (Dubelcco Modificado PBS[®], Vitrocell, Brasil), a 37°C, nos cornos uterinos. A cada 4 seringas de 20 mL, o circuito era fechado com auxílio de uma pinça hemostática curta reta, onde, era acoplado um filtro coletor de embriões (Filtro coletor de embriões para TE[®], Pontovet, Brasil) ou um tubo de 50 mL com tampa rosqueada (Tubo de centrifugação[®], TPP, Suíça) para recuperação do líquido. Foi injetado um total de 400 mL de DMPBS (Dubelcco Modificado PBS[®], Vitrocell, Brasil) e registrada a quantidade de líquido recuperado. Os procedimentos finais da colheita de embriões incluíram a cuidadosa remoção da sonda e pinças. Todo o procedimento foi realizado com o animal na posição quadrupedal, contido em maca apropriada e munido de uma rede protetora, para evitar movimentos laterais e dorsoventrais (Figura 2).

Figura 2. Colheita transcervical. (A) Bloqueio anestésico; (B) inseção do espéculo de Collins vaginal lubrificado; (C), (D) Pinçamento e tracionamento das bordas do ósteo cervical com o auxílio de duas pinças de Allis, (E) inserção da sonda nasogástrica curta n° 10 equipada com o êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos; (F) administração de 20 mL de DMPBS; (G) a cada 4 seringas de 20 mL, o

circuito era fechado com auxílio de uma pinça hemostática; (H) tubo de 50 mL para recuperação do líquido; (I) animal na posição quadrupedal após colheita.



5.5.4 Avaliação dos embriões

O lavado recuperado foi vertido em placas plásticas de Petri (Placa de Petri 100®, Nutricell, Brasil) e submetido à procura e identificação das estruturas em estereomicroscópio (SMZ 645®, Nikon, Japão), utilizando um aumento de 40 a 70X, bem como à avaliação dos embriões, quanto ao seu estágio de desenvolvimento e qualidade, seguindo os critérios morfológicos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON & NELSON, 2010), como embriões de Código I (excelente ou bom), II (regular), III (pobre) e IV (morto ou degenerado).

Além disso, foi avaliada homogeneidade da massa, sendo classificados em embriões homogêneos, levemente heterogêneos ou heterogêneos; nível de extrusão, sendo considerado nulo quando não houve extrusão, baixo quando o

percentual de extrusão foi de 1 a 10%, médio quando o percentual de extrusão foi entre 11 a 20% e alto quando o nível de extrusão ultrapassou os 20%.

5.6. Parâmetros avaliados

Foram observadas as seguintes variáveis: ocorrência e momento do início do estro das doadoras de embriões; percentual de doadoras de embriões ovulando e superovulando; taxa de ovulação das doadoras; quantidade de cérvices ultrapassadas na colheita transcervical; tempo de passagem da sonda; tempo de execução da colheita transcervical de embriões; quantidade do meio recuperado; taxa de recuperação embrionária na colheita transcervical de embriões; taxa de fertilização; estágio de desenvolvimento e características quanti-qualitativas dos embriões recuperados; o número de embriões recuperados; e a taxa de sobrevivência embrionária.

5.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, entre os tipos de protocolos superovulatórios e entre os diferentes dilatadores cervicais, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e foram consideradas estatisticamente diferentes quando apresentarem nível de significância menor que 5%. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher e Qui-quadrado. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Foi utilizado o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (2013).

6. RESULTADOS

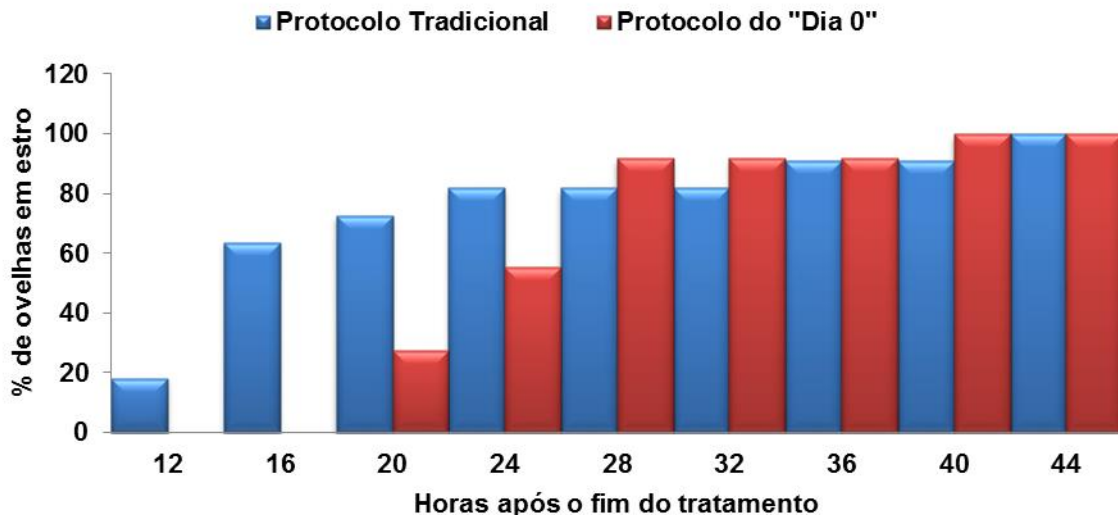
Experimento 1

Dois animais foram retirados do experimento por perderem o CIDR (um do Protocolo Tradicional e outro do Protocolo Dia 0).

Foi observado que todas as doadoras de embriões (100%) apresentaram estro, independentemente do protocolo hormonal utilizado, sendo o intervalo de tempo médio (\pm erro padrão) entre a retirada do CIDR e o início do estro de $20,73 \pm 3,09$ e $25,82 \pm 1,74$, para os protocolos Tradicional e Dia 0, respectivamente ($P > 0,05$).

Os tratamentos geraram uma pequena dispersão de estros e, portanto, uma forte sincronização dos mesmos, pois 81,81% dos animais do Protocolo Tradicional e 90,9% do Protocolo Dia 0, já haviam demonstrado estro 24 e 28 horas, respectivamente, após a remoção do dispositivo, como ilustra a Figura 3.

Figura 3. Percentual de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) exibindo estro de acordo com o protocolo hormonal utilizado (Protocolo Tradicional vs. Protocolo Dia 0).



No que se refere às ultrassonografias realizadas no Protocolo Dia 0, na primeira ultrassonografia havia apenas 10% dos animais apresentando Foliculo Pré-Ovulatório (FPO). Já na segunda, foi observada a presença de pequenos foliculos em 25% dos animais.

Quanto à resposta ovariana após o tratamento superovulatório, não houve diferença significativa entre os protocolos Tradicional e Dia 0 (Tabela 11), sendo ambos os tratamentos superovulatórios eficientes, apresentando (média \pm erro padrão) $17,55 \pm 3,48$ e $14,00 \pm 2,63$ corpos lúteos, respectivamente.

Foi observada ainda, a presença de FPO persistentes em dois animais do Protocolo Tradicional (cada animal apresentando 1 FPO) e em quatro do Protocolo Dia 0 (totalizando 13 FPO, sendo que, em apenas um dos animais, foram encontrados 9 FPO), além da presença de 3 cistos foliculares em um animal do Protocolo Tradicional.

Quanto à produção de embriões, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos hormonais, para os diversos parâmetros avaliados ($P > 0,05$) (Tabela 11).

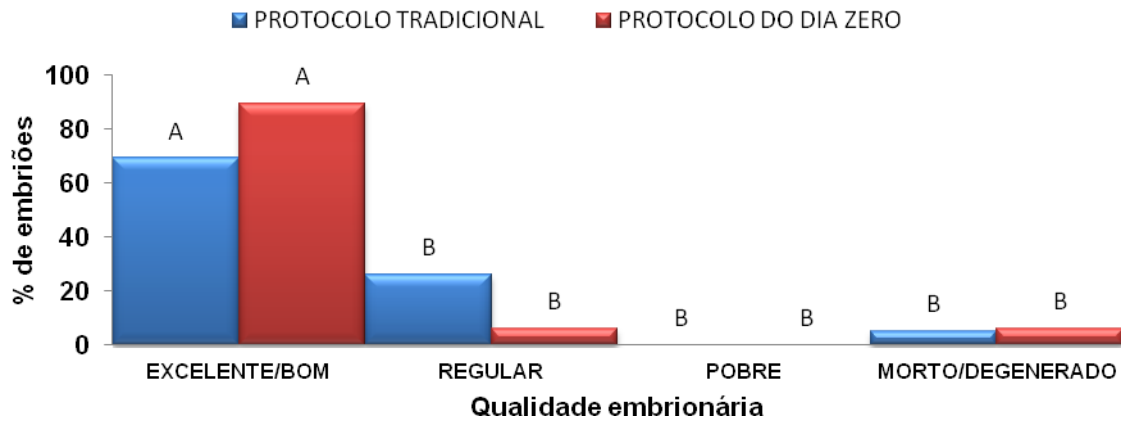
Tabela 11. Número de estruturas recuperadas, número total de embriões, de embriões transferíveis e congeláveis (média \pm e.p.), bem como taxas de fecundação, embriões transferíveis e congelabilidade de ovelhas mestiças (Dorper e Santa Inês), de acordo com o tratamento hormonal utilizado (Protocolo Tradicional vs. Protocolo Dia 0).

| | Protocolo Tradicional | Protocolo Dia 0 |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Nº. de ovelhas superovulando | 9 (81,81%) | 11 (100%) |
| Nº. de estruturas recuperadas | $2,90 \pm 2,01$ | $2,99 \pm 1,97$ |
| Nº. de embriões recuperados | $1,72 \pm 1,29$ | $1,63 \pm 1,20$ |
| Nº. de embriões transferíveis | $1,63 \pm 1,20$ | $1,54 \pm 1,11$ |
| Nº. de embriões congeláveis | $1,63 \pm 1,20$ | $1,54 \pm 1,11$ |
| Taxa de fecundação* | 59,37 (19/32) | 54,54 (18/33) |
| Taxa de embriões transferíveis ** | 94,73 (18/19) | 94,44 (17/18) |
| Taxa de congelabilidade*** | 94,73 (18/19) | 94,44 (17/18) |

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

Com relação à qualidade ou viabilidade embrionária, observou-se que não houve interferência do protocolo hormonal utilizado ($P > 0,05$). Assim, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os protocolos, quanto ao grau de qualidade dos embriões (Figura 4).

Figura 4. Grau de qualidade de embriões produzidos *in vivo* a partir de ovelhas mestiças (Dorper e Santa Inês) de acordo com o protocolo hormonal utilizado (Protocolo Tradicional e Protocolo Dia 0).



^{A, B} Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

De forma semelhante, foi observada numa maior ($P < 0,05$) proporção de embriões sem extrusão em comparação aos embriões que apresentaram extrusão, dentro do mesmo tratamento. O protocolo Dia 0 promoveu maior ($P < 0,05$) homogeneidade de massa nos embriões em comparação ao protocolo Tradicional (Tabela 12).

Tabela 12. Graus de qualidade, Grau de Homogeneidade da massa embrionária, Grau de extrusão, de embriões produzidos *in vivo* a partir de ovelhas mestiças (Dorper e Santa Inês) de acordo com o protocolo hormonal utilizado (Protocolo Tradicional vs. Protocolo Dia 0).

| Variáveis | Protocolo Tradicional (n = 19) | Protocolo Dia 0 (n = 19) |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| QUALIDADE DOS EMBRIÕES | | |
| Excelente/Bom | 68,4% (13) ^A | 78,9% (15) ^A |
| Regular | 26,3% (5) ^B | 10,5% (2) ^B |
| Pobre | 0,0 | 0,0 |
| Morto/Degenerado | 5,3 (1) ^B | 10,5 (2) ^B |
| HOMOGENEIDADE DE MASSA | | |
| Homogêneo | 36,8% (7) ^a | 82,2% (16) ^{Ab} |
| Levemente Heterogêneo | 36,8% (7) ^a | 5,3% (1) ^{Bb} |

| | | |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| Heterogêneo | 26,3% (5) | 10,5% (2) ^B |
| EXTRUSÃO (%) | | |
| Nulo (0 %) | 52,6% (10) ^A | 63,1% (12) ^A |
| Baixo (1 a 10%) | 26,3% (5) ^{AB} | 26,3% (5) ^B |
| Médio (11 a 20%) | 21,0% (4) ^B | 10,5% (2) ^B |
| Alto (>20%) | 0,0 | 0,0 |

Valores com letras minúsculas (a, b) diferentes na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste χ^2 .

Valores com letras maiúsculas (A, B) diferentes na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste χ^2 .

Experimento 2

Com relação à colheita transcervical, a inserção da sonda nasogástrica acoplada ao êmbolo do aplicador de inseminação artificial bovino não foi possível em 63,64% no Grupo Controle, que não utilizou nenhum fármaco para promover a dilatação cervical. Já no Grupo Misoprostol, a passagem e a, conseqüente, colheita não foi possível em apenas 36,36% dos animais. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($P > 0,05$), como podemos observar na Tabela 13.

Tabela 13. Transposição da cérvix e colheita transcervical de embriões, sem e com administração de Misoprostol (PGE_1) como agente dilatador cervical em ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) superovuladas com pFSH.

| Variável | Sem Misoprostol* | Com Misoprostol** |
|----------------------------|------------------|-------------------|
| Nº de animais | 11 | 11 |
| Nº de animais colhidos (%) | 4 (36,36) | 7 (63,64) |
| Tempo (min) | | |
| Passagem da sonda | 23,06 | 15,69 |
| Execução da colheita | 114,77 | 72,03 |
| Taxa de recuperação | 12,28 (21/171) | 12,00 (21/175) |

*Sem Dilatador (Grupo controle): aplicação de solução fisiológica, seis horas antes da colheita transcervical no canal vaginal; **Com dilatador: aplicação de misoprostol, seis horas antes da colheita transcervical no canal vaginal ($P > 0,05$).

O percentual geral de líquido recuperado na colheita Transcervical foi de 69%. Quando comparamos essa recuperação entre o grupo tratado com Misoprostol e o grupo Controle, temos 63,40% e 36,60%, respectivamente ($P > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Experimento 1

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros relacionados com o protocolo hormonal utilizado. Estudos anteriores (MENCHACA et al., 2007; 2009) que comparam os protocolos Tradicional e Dia 0, demonstraram uma superioridade do protocolo Dia 0, tanto em caprinos quanto em ovinos.

Sabe-se que, nas mais diversas espécies, a presença de um folículo grande ou FPO no momento do início do tratamento superovulatório com FSH está relacionada com um menor recrutamento e estimulação dos folículos pequenos, tendo, como consequência, uma menor resposta ovariana, afetando a produção embrionária (MENCHACA et al., 2009). Portanto, atualmente, há uma preocupação em evitar a presença desses folículos grandes no início da administração do FSH tanto em ovinos (VEIGA-LÓPEZ et al., 2005; 2006) quanto em caprinos (MENCHACA et al., 2002; COGNIÉ et al., 2003; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2005). Segundo Bari et al. (2001), o protocolo Dia 0 foi proposto para evitar o domínio de um folículo grande sobre os folículos pequenos, através da iniciação do tratamento com FSH logo após a ovulação.

No que se refere aos dados de ocorrência do estro do presente estudo, foi observado que o protocolo de sincronização do estro e da ovulação utilizado nas doadoras foi efetivo em ambos os tratamentos hormonais utilizados, visto que, todas as doadoras de embriões (100%) apresentaram estro. Nossos resultados referentes ao Protocolo Dia 0 foram superiores aos encontrados por Lehloenya e Greyling (2010), que também fizeram uso do Protocolo Dia 0 em ovelhas e obtiveram 71,4% dos animais exibindo estro. No entanto, estão de acordo com os encontrados por Padilha et al. (2011), que também encontraram 100% de estro, trabalhando com CIDR em ovelhas deslanadas e Menchaca et al. (2009), que compararam o uso do Protocolo Dia 0 ao Tradicional em ovelhas, e obtiveram 100% e 95,5% das fêmeas em estro, para os protocolos Tradicional e Dia 0, respectivamente.

Com relação ao intervalo entre a retirada do CIDR e o início do estro, os valores encontrados para os protocolos Tradicional e Dia 0, $20,73 \pm 3,09$ h e $25,82 \pm 1,74$ h, respectivamente ($P > 0,05$), foram precoces quando comparados àqueles

encontrados por Lehloenya e Greyling (2010), que obtiveram $36,4 \pm 0,5$ h no Protocolo Dia 0 e $33,0 \pm 1,0$ h e $28,6 \pm 0,5$ h no Protocolo Tradicional com e sem $\text{PGF}_{2\alpha}$, respectivamente. Esta superioridade, pode estar relacionada ao uso do GnRH no presente estudo, que é responsável por possibilitar de forma mais eficiente a sincronização do estro e o momento da ovulação (MENCHACA & RUBIANES, 2004).

A ausência de resultados superiores no tratamento que utilizou o Protocolo Dia 0 no presente estudo pode estar relacionada com um baixo recrutamento folicular no início do tratamento superovulatório, o que foi evidenciado pelo baixo percentual (75%) de animais com folículos pequenos, no momento da administração do pFSH, observado no momento da segunda ultrassonografia, que deveria confirmar a ocorrência da ovulação e, portanto, a presença de, apenas, pequenos folículos no ovário, para que houvesse um maior recrutamento. Além disso, como no Protocolo Tradicional não é feito um acompanhamento da dinâmica folicular, para que os animais estejam homogêneos com relação ao “status” ovariano no momento da superovulação, não pode ser descartada a possibilidade de haver mais animais no início da emergência folicular, ou seja, com pequenos folículos presentes no ovário, sem a presença de um folículo grande para suprimir a resposta ovariana, produzindo, conseqüentemente, melhores respostas ao tratamento.

Outro fator muito importante, que deve ser sempre lembrado, é sobre o momento de ocorrência da primeira onda folicular, uma vez que esta pode variar nas mais diferentes raças (LEHLOENYA & GREYLING, 2010). Baseado nos resultados que obtivemos na primeira ultrassonografia (onde, se buscava encontrar FPO nos ovários), obtivemos apenas 10% dos animais apresentando FPO, ou seja, um indicador de que em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês, criadas no semiárido do Nordeste do Brasil, o tempo fixo pré-determinado para o início do tratamento superovulatório, ocorreu de forma precoce. Lehloenya e Greyling (2010), também testando o Protocolo Dia 0, explicou os resultados inferiores do Protocolo Dia 0, quando comparado ao Tradicional, justamente através dessa antecipação no início do tratamento com o pFSH. No entanto, nesse estudo, não foi realizada a aplicação de eCG, fundamental para que haja uma concentração e antecipação do momento da ovulação.

A ocorrência de FPO e cistos foliculares no momento da colheita embrionária no presente estudo pode ter sido causada por uma superestimulação ovariana,

causada pela dose de pFSH utilizada, que foi de 240 mg. Esta dose foi administrada em animais que se encontravam em latitude de 9° 24' 42" S, ou seja, onde não ocorre dominância do fotoperíodo sobre a atividade sexual, estando os animais se encontravam naturalmente receptivos à reprodução.

Simonetti et al. (2008) relatam que a presença de folículos grandes anovulatórios, juntamente com a sua maior produção individual hormonal, pode produzir concentrações anormalmente elevadas de estradiol. Essas altas concentrações podem afetar o ambiente uterino e, portanto, interferir na captura de oócitos pelas fímbrias (MURRAY et al., 1994) ou no transporte dos mesmos (MURRAY et al., 1994) e espermatozóides através do trato genital feminino (EVANS & ARMSTRONG, 1984).

Protocolos de superovulação que utilizam altas doses de pFSH em protocolos decrescentes estão relacionados com um desenvolvimento folicular rápido e anormal, prejudicando, conseqüentemente, a sincronização do crescimento do oócito-folículo, resultando na redução da qualidade embrionária (SIMONETTI et al., 2008). Isto é consistente com o padrão geral de uma associação entre uma maior estimulação ovariana e uma diminuição de oócitos e / ou produção de embriões (ARMSTRONG & EVANS, 1983). Além disso, essa diminuição tem sido observada regularmente em animais tratados com altas doses de gonadotrofina, sugerindo que pode estar relacionado à estimulação excessiva do folículo e / ou a altos níveis circulantes de estrogênio durante a fase luteal inicial.

Experimento 2

Com relação aos resultados referentes à colheita transcervical de embriões com e sem o uso do Misoprostol, como dilatador, também não foi encontrada diferença significativa para nenhum dos parâmetros avaliados.

A anatomia e fisiologia da cérvix ovina forma uma barreira natural para o útero (GÜNDÜZ et al., 2010) e esta é uma das principais razões pela técnica de colheita transcervical em ovinos ainda não ser muito realizada nesta espécie. Os anéis cervicais nas ovelhas são em torno de cinco (DOBSON, 1988), se encontram, concentricamente, alinhados, possuindo sua abertura estreita, com, na maioria dos casos, menos de 3 mm de diâmetro (HALBERT et al., 1990). O Misoprostol, análogo sintético da prostaglandina E₁, é bastante utilizado como dilatador cervical (BARBAS

et al., 2001; 2003; DE ROSSI et al., 2009; GUSMÃO et al., 2007; GUSMÃO et al., 2009), por possuir, como característica principal, aumentar o tônus uterino, favorecendo a dilatação cervical e amolecimento do colo uterino (COELHO, 1998), facilitando, conseqüentemente, a passagem dos anéis cervicais, principalmente na espécie ovina.

Nesse estudo, a transposição dos anéis cervicais, no grupo tratado com Misoprostol, foi possível em 63,63% das doadoras, resultados semelhantes encontrados por Gusmão et al. (2007), trabalhando com ovelhas Santa Inês, demonstrando que, mesmo não havendo diferença entre os grupos estudados (com e sem dilatador - Misoprostol), o número total de cérvices ultrapassadas demonstram que a técnica de colheita transcervical é possível em ovelhas. Além da aplicação prévia do Misoprostol, a utilização das pinças na tração da cérvix e a colocação do êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos, para auxiliar a dilatação mecânica do canal cervical, foram indispensáveis na colheita transcervical (GUSMÃO et al., 2009).

Além disso, um fator muito importante nas colheitas transcervicais e de extrema relevância é a quantidade de partições no histórico das doadoras. No presente estudo, somente foram utilizados animais com, no mínimo, duas partições. Sousa (1999), trabalhando com ovelhas da Raça Santa Inês, pluríparas, obteve 100% de sucesso na colheita, enquanto Mylne et al. (1992) obtiveram apenas 46% de sucesso na colheita transcervical, trabalhando também com ovelhas pluríparas e 5% com ovelhas nulíparas.

Com relação ao tempo de execução da colheita transcervical, o grupo que utilizou o Misoprostol, como dilatador cervical, obteve um tempo de execução de, em média, 72,3 minutos. Nosso tempo foi menor, quando comparado com os obtidos por Suyadi, Sohnrei e Holtz (2000), os quais realizaram o procedimento durante 77 minutos, quando realizaram a colheita transcervical em cabras tratadas com PGF_{2α}. No entanto, esse tempo foi maior ao encontrado por Gusmão et al. (2007; 2009), os quais também utilizaram o Misoprostol como dilatador em ovelhas da raça Santa Inês e Dorper, com tempo de 32,75 e 30,14 minutos, respectivamente.

A transposição da cérvix está relacionada com a raça, ordem de parto, entre outros (SOUSA, 1999; ALMEIDA et al., 2002). Gusmão et al. (2007) observaram em seu estudo que a Santa Inês, raça sintética, sofre influência sanguínea de outras raças, ocasionando mudanças nas características anatômicas, acarretando uma

grande variabilidade na eficiência da passagem cervical. No presente estudo, foram utilizadas raças mestiças de Dorper com Santa Inês, com maior influência Dorper, podendo ter ocorrido mudanças anatômicas, interferindo no tempo de passagem.

Gusmão et al. (2009) utilizaram, para facilitar a passagem cervical, a vela de Hegar e, depois, um mandril de aço inoxidável para auxiliar a passagem da sonda, obtendo êxito na técnica realizada. Já no presente estudo, foi utilizado apenas a sonda com o auxílio do mandril para transpor a cérvix, por ter um calibre menor que a vela de Hegar, auxiliando e facilitando na passagem dos anéis cervicais, e além disso, o tempo de realização da colheita está bastante relacionado com a habilidade do técnico.

No que diz respeito à taxa de recuperação de embriões, nosso resultado foi inferior quando comparado com trabalhos utilizando cabras Boer (79%; SUYADI et al., 2000) e Saanen (53,2%; LIMA-VERDE et al., 2003) na colheita transcervical, respectivamente. Nossos resultados podem estar relacionados com a quantidade de líquido recuperado, a qual foi pequena, ou seja, apenas de 69%, sendo inferior aos achados por Gusmão et al. (2009), que conseguiram recuperar 95,7% do líquido. Além disso, a hiperestimulação folicular, causada pela alta dose de pFSH, utilizada nesse estudo, pode ter influenciado negativamente na taxa de recuperação, visto que estudos recentes (WU et al., 2011) demonstram que a redução da dose total de pFSH para 120 mg, com redução no número de aplicações, não alterou a resposta superovulatória e a produção de embriões de ovelhas.

A hiperestimulação ocorre quando há maiores taxas de ovulação, afetando negativamente a recuperação de embriões (SIMONETI et al., 2008). Quando há altos níveis de estradiol, ocorre modificação no ambiente uterino, e, com o hiperestrogenismo, as fímbrias podem não recuperar de maneira eficaz os oócitos e, se não há a presença de oócitos nos cornos uterinos, torna-se impossível a recuperação de qualquer estrutura através da lavagem dessa estrutura. Além disso, altos níveis de estrógeno estão associados também a uma maior estimulação do ovário e uma diminuição na quantidade e qualidade dos oócitos e / ou de embriões (D'ALESSANDRO et al., 2005).

8. CONCLUSÕES

Dessa forma, pode-se concluir que o Protocolo Dia 0 não foi eficaz no incremento das respostas estral e ovariana e na produção *in vivo* de embriões de ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês. No entanto, o efeito do momento do início da superovulação no protocolo Dia 0, bem como a dose de pFSH utilizada necessitam de mais estudos em diferentes raças ovinas.

Com relação à colheita transcervical, o dilatador cervical Misoprostol não aumentou a permeabilidade cervical e a taxa de recuperação de embriões colhidos pela via transcervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês. Faz-se necessário avaliar o efeito do Misoprostol e de outros dilatadores cervicais em raças ovinas de menor porte e de diferentes ordens de parto.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. M.; CÂMARA, D. R.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, D. P. F.; MEDEIROS, J. N.; ALVES, O. M. M. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p.82-84, 2002.

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

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 19, p. 31-42, 1983.

BALDASSARRE, H. Coleta, conservação e transferência de embrião. In: Aisen, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: Med Vet. Cap. 11, p.143-152, 2008.

BARBAS, J. P.; GONÇALVES, S. C.; BAPTISTA, M. C.; MARQUES, C. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix (misoprostol e sulfato de terbutalina) sobre os resultados da IA em raças ovinas locais. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 185-185, 2003.

BARBAS, J. P.; GONÇALVES, S. C.; MARQUES, C. C.; HORTA, A. E. M. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix durante a fase folicular do ciclo em ovelhas. In: III Congresso Ibérico de Reprodução Animal, **Anais...** p. 299-307, 2001.

BARCELOS, C. M.; BARROS, M. B.; NOGUEIRA, M. F. G. Fatores que afetam a produção *in vivo* de embriões. **Biológico**, v.69, p.49-53, 2007.

BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERRELL, B. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. **Theriogenology**, v. 59, p. 1265-1275, 2003.

BARI, F.; KHALID, M.; WOLF, B.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERRELL, B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep.

Theriogenology, v. 56, p.147–155, 2001.

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

BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N. C. 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 non breeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, p. 311–327, 2004.

BARRY, D. M.; VAN NIEKERK, C. H.; RUST, J.; VAN DER WALT, T. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. **Theriogenology**, v. 33, p. 190, 1990.

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

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

BREUEL, K. F.; BAKER, R. D.; BUTCHER, R. L.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A.; LERNER, S. P. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. **Theriogenology**, v. 36, p.241-255, 1991.

CEZAR, M.C. **Características de carcaça e adaptabilidade fisiológica de ovinos durante a fase de cria**. Areia-PB, 2004. 88p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias/ Universidade Federal da Paraíba.

COELHO, H. L. Misoprostol: a solução não é tão simples. **Revista de Saúde Pública**, v.32, p. 394-395, 1998.

COGNIÉ, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 105-116, 1999.

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

COLEMAN, D. A., DAILEY, R. A., LEFFEL, R. E., BAKER, R. D. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. **Journal of Dairy Science**, v.70, p. 858, 1987.

CORDEIRO, M. F. Alguns aspectos sobre métodos de colheita de embriões em caprinos. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Bahia, 1997.

CORDEIRO, M. F.; LIMA VERDE, J. B.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FARIAS, L. N.; SALLES, H. O.; SIMPLÍCIO, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 19-23, 2003.

CROY, B. A.; PRUDENCIO, J.; MINHAS, K.; ASHKAR, A. A.; GALLIGAN, C.; FOSTER, R. A.; BUCKRELL, B.; COOMBER, B. L. A preliminary study on the usefulness of huil-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. **Theriogenology**, v.52, p. 271-287, 1999.

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

DONALDSON L. E. Matching of embryo stages and grades with recipients oestrus synchrony in bovine embryo transfer. **Veterinary Record**, v. 117, p. 489-491, 1985.

DOBSON, H. Softening and dilation of the uterine cervix. **Oxford Review of Reproduction and Biology**, v. 10, p. 491–514, 1988.

DeROSSI, R.; CARNEIRO, R. P. B.; OSSUNA, M. R.; ZANENGA, N. F.; ALVES, O.D.; JORGE, T. P.; COSTA-E-SILVA, E.V.; VASCONCELOS, J. Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. **Small Ruminant Research**, v. 83, p.74–78, 2009.

DUGGAVATHI, R., BARTIEWSKI, P. M., BARRETT, D. M. W., RAWLINGS, N. C. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to asses changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves incyclic ewes. **Theriogenology**, v.60, p. 495-510, 2003.

EHLING, C.; WIRTH, P.; SCHINDLER, L.; HADELER, K. G.; DO"PKKE, H. H.; LEMME, E.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Laparoscopical intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved 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.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M.P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, p. 699–715, 2000.

EVANS, G.; ARMSTRONG, D. T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 47–53, 1984.

FERNANDES, C. A. C. Superovulação em bovinos. Alfenas-MG, 2003. Disponível em: < www.beefpoint.com.br > Acesso em: 25 mai. 2013.

FLOHR, S. F.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; LEWIS, G. S. Technical note: development of transcervical oocyte recovery procedure for sheep. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 3583-3586, 1999.

FONSECA J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. 9 f. 1 CD-ROM.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M. et al. Freezing goat embryos using ethylene glycol and a slow cooling rate. In: 9TH ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR REPRODUCTION IN DOMESTIC, 2005, Murcia. **Proceedings** of the 9th annual conference of the European Society for Reproduction in Domestic Animals. ESDAR, 2005.

FONSECA, J. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; VIANA, J. H. M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.113-117, 2011.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v.43, p.689–703, 1995.

GONZALEZ-BULNES, A., BAIRD, D. T., CAMPBELL, B. K., COCERO, M. J., GARCIA-GARCIA, R. M., INSKEEP, E. K., LOPEZ-SEBASTIAN, A., MCNEILLY, A. S., SANTIAGO-MORENO, J., SOUZA, C. J. H., VEIGA-LOPEZ, A. Multiple factors

affecting efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p 421–435, 2004.

GONZALEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J. A.; DÍAZ-DELFA, C.; GARCIA-GARCIA, R. M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. **Small Ruminant Research**, v.48, p. 9-14, 2003.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GARCÍA-GARCÍA, R. M.; VEIGA-LÓPEZ, A.; SOUZA, C. J. H.; MCNEILLY, A. S. Restoration of endocrine and ovarian function after stopping GnRH antagonist treatment in goats. **Theriogenology**, v. 63, p.83–91, 2005.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D. T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology**, v. 57, p. 1263–72, 2002.

GREYLING, J. P. C.; NEST, M. V. D.; SCHWALBACH, L. M. J.; MULLER, T. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. **Small Ruminant Research**, v.43, p. 45-51, 2002.

GUNDUZ, M. C.; TURNA, O.; CIRIT, U.; UÇMAK, M.; TEK, Ç.; SABUNCU, A.; BACINOGLU, S. Lambing rates and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 32-36, 2010.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; BITTENCOURT, T. C. C.; MARTINS, L. E. P.; GORDIANO, H. D.; BARBOSA, L. P.; Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 313-318, 2009.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; BARBOSA, L. P. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça santa Inês no Semiárido Nordestino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p.1-10, 2007.

HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S. The structure of the cervical canal of ewe. **Theriogenology**, v.33, p. 977-992, 1990.

HASLER, J. F.; BOWEN, R. A.; NELSON, L. D.; SEIDEL Jr, G.E. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 71-78, 1980.

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

HOLTZ, W. Embryo Transfer in Goats in Europe: State of the Art and Future Perspectives. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1.,2000, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, p.265, 2000.

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, p. 172–181, 2004.

LEHLOENYAA, K. C.; GREYLING, J. P. C. The ovarian response and embryo recovery rate in Boer goat does following different superovulation protocols, during the breeding season. **Small Ruminant Research**, p. 38–43, v. 88, 2010.

LIMA-VERDE, J. B.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; PAULA, N. R. O.; MEDEIROS, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **South African Journal of Animal Science**, v.33, p.127-131, 2003.

MARTEMUCCI, G.; D'ALESSANDRO, A. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGF_{2α} and estradiol benzoate treatments. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 41-47, 2010.

MARTEMUCCI, G.; D'ALESSANDRO, A.; TOTEDA, F.; FACCIOLONGO, A. M.; GAMBACORTA, M. Embryo production and endocrine response in ewes superovulated with PMSG with or without monoclonal anti-PMSG administered at different time. **Theriogenology**, v. 44, p. 691–703, 1995.

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.

McKELVEY, W. A. C.; McEVOY, T. G.; DINGWALL, W. S.; ROBINSON, J. J.; LINDSAY, E.; KING, M. E.; FITZSIMONS, J.; MYLENE, M. J. A. The use of exogenous hormones to facilitate transcervical embryo recovery in sheep and their effect on embryo development. **Theriogenology**, v.47, p.369, 1997.

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. **Theriogenology**, v. 58, p. 1713–21, 2002.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 403-413, 2004.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1111–1117, 2007.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**, v. 72, p. 477-483, 2009.

MURRAY, J. F.; DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J.; EVANS, G. 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.

MYLNE, M. J. A. ; McKELVEY, W. A. C. ; FERNIE, K. ; MATTHEWS, K. Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. **Veterinary Record**, v. 130, p. 450-451, 1992.

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

NRC, 2007 (National Research Council). Acesso em 23 de dezembro de 2011, às 14 horas.

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, V.S. Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758) Utilizadas em Transferência de Embriões. 1992. 97 p. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

OLIVEIRA, V.S.; GONZALES, C. I. M. Transferência de embriões em caprinos. In: Simpósio Nordestino Sobre Caprinos e Ovinos Deslanados, 1, 1992, Taperoá, PB. **Anais...** Taperoá: Associação Paraibana de Criadores de Caprinos e Ovinos, 1992. p. 21-31.

OLIVEIRA, T.M. Parâmetros quali-quantitativos na seleção de receptoras em programas de transferência de embriões ovinos. 2009. 71 p. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

PADILHA, T.R; MAGALHÃES, D. M; MAIA-JUNIOR, A.; BRASIL, F. A; ARAÚJO, A. A. 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**, v.6, p.538-543, 2011.

PEREIRA, R. J. T. A.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F_{2α} and oxytocin. **Journal of Animal Science**, v.76, p.360-363, 1998.

PIERSON, J. T.; BALDASSARRE, H.; KEEFER, C.L.; DOWNEY, B.R. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. **Theriogenology**, v.60, p. 397–406, 2003.

PONTES, J. A. C. Transferência embrionária em caprinos. **Tese** (Doutorado). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 1990.

POPE, W. F.; LAWYER, M. S.; NARA, B. S.; FIRST, N. L. Effect of asynchronous superinduction on embryo survival and range of blastocyst development in swine. **Biology of Reproduction**, v.35, p.133–137, 1986.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; FILHO, A. S. S. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.127-177, 2002.

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

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiología reproductiva em cabras y ovejás. In: Simpósio sobre o controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, São Paulo – SP. **Anais...** São Paulo – SP: FMVZ – USP. 2000.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, v. 43, p. 465–72, 1995.

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

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

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.

SANTANA, A. F. Transferência de embriões em caprinos. Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes (**Seminário**) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-Ceará, 1994.

SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. **Theriogenology**, v.46, p.233-241, 1996.

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

SILVA, J. C.; MELLO, A.; RESENDE, J.; OLIVEIRA, J. V. L.; ANDRADE MOURA, J. C.; RIBEIRO FILHO, A. L.; COELHO LIMA, M. C.; BONINA, G.; GUSMÃO, A. L. Superovulação de Ovelhas Santa Inês Através de uma única Injeção Subcutânea de FSH Dissolvido em Polivinilpirrolidona. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 24, 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.500, 2001.

SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H. D.; MARTINS, L. P.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; GUSMÃO, A. L. Avaliação da colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 90, 2004.

SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, J.; MARTINS, L. P.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; BITTENCOURT, T.; GUSMÃO, A. L. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Dorper no semi-árido nordestino. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 16., 2005, Goiânia. **Anais...Goiânia**, 2005.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, p. 227–237, v. 104, 2008.

SOUSA, J. H. M. Coleta de embriões e resposta superovulatória utilizando diferentes preparações de FSH em ovelhas deslanadas na região semiárida da Paraíba. 1999. 57p, **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba.

SOUZA, M. I. L.; GONÇALVES, P. B. D.; LUZ, S. L. N. et al. Características morfológicas e penetrabilidade cervical visando à inseminação artificial em ovinos. **Ciência Rural**, v.24, p.591- 595, 1994.

SUYADI, S. B.; HOLTZ, W. Transcervical embryo collection in Boer goats. **Small Ruminant Research**, v. 36, p. 195-200, 2000.

TERVIT, H. R.; GOLD, P. G.; MCKENZIE, R. D.; CLARKSON, D. J.; DRUMMOND, J. Embryo transfers in Angora and Saanen goats. **New Zealand Veterinarian Journal**, v. 33, p. 78–80, 1985.

TORRES, S.; SEVELLEC, C. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 27, p. 859-863, 1987.

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.

VAN NIEKERK, C. H.; BARRY, D. M.; RUST, J. M.; VAN DER WALT, T.; LANGENHOVEN, J. Cervical softening with prostaglandin E2 and estradiol cypionate for embryo collection in goats. **Theriogenology**, v.33, p.348, 1990.

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

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TRESGUERRES, J. A. F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARRETA, C.; COCERO, M. J. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, p.76-87, 2006.

WALKER, S. K.; SMITH, D. H.; FRENHAM, A.; ASHMAN, R. J.; SEAMARK, R. F. The use of synthetic gonadotrophin hormone treatment in the collection of sheep embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 741-752, 1989.

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

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; COSTINE, B.A.; LEWIS, G.S. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: Application to transcervical embryo transfer. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 2587-2593, 1999.