



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR A
EFICIÊNCIA DA SINCRONIA DO ESTRO E OVULAÇÃO EM OVELHAS
DESLANADAS**

NATHALIA HACK MOREIRA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR A
EFICIÊNCIA DA SINCRONIA DO ESTRO E OVULAÇÃO EM OVELHAS
DESLANADAS**

NATHALIA HACK MOREIRA

ORIENTADOR: ALEXANDRE FLORIANI RAMOS

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 172D/2016

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MOREIRA, N. H. **Avaliação de diferentes alternativas para aumentar a eficiência da sincronia do estro e ovulação em ovelhas deslanadas**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 154p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MM838a	Moreira, Nathalia Hack Avaliação de diferentes alternativas para aumentar a eficiência da sincronia do estro e ovulação em ovelhas deslanadas / Nathalia Hack Moreira; orientador Alexandre Floriani Ramos. -- Brasília, 2016. 154 p. Tese (Doutorado - Doutorado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2016. 1. Sincronização do estro. 2. Ovulação. 3. Ovino. 4. Fertilidade. 5. Inseminação. I. Ramos, Alexandre Floriani, orient. II. Título.
--------	---

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR A
EFICIÊNCIA DA SINCRONIA DO ESTRO E OVULAÇÃO EM OVELHAS
DESLANADAS**

NATHALIA HACK MOREIRA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, Doutor (EMBRAPA) (ORIENTADOR)

IVO PIVATO, Doutor (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)

RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, Doutor (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)

FELIPE ZANDONADI BRANDÃO, Doutor (UFF) (EXAMINADOR EXTERNO)

SONY DIMAS BICUDO, Doutor (UNESP) (EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 8 de dezembro de 2016.

Principalmente à Deus e aos meus pais, que sempre me deram condições de seguir em frente. Às minhas irmãs e melhores amigas. Ao meu querido amor, Oscar, uma das pessoas mais importantes na realização deste sonho. À vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Alexandre Floriani Ramos, pela oportunidade de crescimento pessoal.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora e contribuir de alguma forma para o enriquecimento científico deste trabalho.

Ao doutorando Oscar Oliveira Brasil, por todos os ensinamentos, discussões científicas, auxílio durante os períodos experimentais e de estudos.

Aos colegas de PIBIC, mestrandos e doutorandos, pelas discussões acadêmicas e auxílio durante o período experimental.

Aos funcionários da EMBRAPA do Setor Campo Experimental Fazenda Sucupira, pelo auxílio, no laboratório e no campo, durante todo o período do doutorado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte ao trabalho realizado.

À Universidade de Brasília (UnB) e o programa de Pós-Graduação em Ciências Animais.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todos, meu muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Ciclo estral	5
3.1.1 Sazonalidade reprodutiva	5
3.1.2 Comportamento de estro	7
3.1.3 Dinâmica folicular ovariana	7
3.2 Protocolos hormonais	9
3.3 Alternativas para aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização do estro ovino	9
3.3.1 Progesterona e análogos (progestágenos)	9
3.3.2 Promotores do desenvolvimento folicular	10
3.3.3 Sincronização em diferentes épocas do ano	12
3.3.4 Utilização do estradiol exógeno para o controle da condição folicular ovariana	13
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 2 - SINCRONIA DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS SOB CONDIÇÕES TROPICAIS, NA ÉPOCA CHUVOSA E SECA, UTILIZANDO PROTOCOLO LONGO COM eCG OU FSH:LH	22
1 RESUMO	23
2 ABSTRACT	24
3 INTRODUÇÃO	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Animais e delineamento experimental	27
4.2 Avaliação do estro	28
4.3 Avaliação ultrassonográfica	29
4.4 Dosagem hormonal	30
4.5 Análise estatística	30
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	40
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 3 - SINCRONIA DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS SOB CONDIÇÕES TROPICAIS, EM DIFERENTES ÉPOCAS, UTILIZANDO PROTOCOLO LONGO COM eCG	44
1 RESUMO	45
2 ABSTRACT	46
3 INTRODUÇÃO	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Animais e delineamento experimental	49
4.2 Avaliação do estro	51

4.3 Avaliação ultrassonográfica	51
4.4 Dosagem hormonal.....	52
4.5 Análise estatística	52
5 RESULTADOS	54
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO.....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 4 - EFEITO DO ESTRADIOL E SEUS ÉSTERES SOBRE A LIBERAÇÃO DE GONADOTROFINA E DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS DESLANADAS TROPICALMENTE ADAPTADAS SINCRONIZADAS COM PROGESTERONA.....	66
1 RESUMO	67
2 ABSTRACT	68
3 INTRODUÇÃO.....	69
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
4.1 Animais.....	72
4.2 Experimento 1	72
4.3 Experimento 2	73
4.4 Análise estatística	75
5 RESULTADOS	76
5.1 Experimento 1	76
5.2 Experimento 2	80
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO.....	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CAPÍTULO 5 - EFEITO DO MOMENTO DA APLICAÇÃO E DA DOSE DE eCG SOBRE SINCRONIA DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS SOB CONDIÇÕES TROPICAIS.....	93
1 RESUMO	94
2 ABSTRACT	95
3 INTRODUÇÃO.....	96
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
4.1 Animais e delineamento experimental	97
4.2 Avaliação do estro	98
4.3 Avaliação ultrassonográfica	98
4.4 Dosagem hormonal.....	99
4.5 Análise estatística	99
5 RESULTADOS	101
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÃO.....	108
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CAPÍTULO 6 - SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM OVINOS: O USO DA PROGESTERONA PERMITE UMA ELEVADA SINCRONIA DA OVULAÇÃO E AUMENTA A TAXA DE FERTILIDADE COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA	112
1 RESUMO	113
2 ABSTRACT	114
3 INTRODUÇÃO.....	115
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	117
4.1 Animais e delineamento experimental	117
4.2 Experimento 1	118

4.3 Experimento 2	119
4.4 Experimento 3	120
4.5 Análise estatística	120
5 RESULTADOS	122
5.1 Experimento 1	122
5.2 Experimentos 2 e 3	124
6 DISCUSSÃO	126
7 CONCLUSÃO	129
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
CONSIDERAÇÕES FINAIS	133

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Capítulo 2		
Figura 1	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG (a) ou FSH:LH (b), nas épocas chuvosa (c) ou seca (d).	33
Figura 2	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG (a) ou FSH:LH (b), nas épocas chuvosa (c) ou seca (d).	34
Figura 3	Média \pm D.P. do número de corpos lúteos (a), volume total dos CL (mm ³) (b) e concentração de progesterona (ng/mL) (c), em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando os tratamentos com eCG ou FSH:LH, nas épocas chuvosa e seca.	35
Capítulo 3		
Figura 1	Média \pm D.P. do momento do início da manifestação do estro, momento da ocorrência da ovulação e intervalo estro/ovulação durante as épocas chuvosa (fevereiro), transição chuvosa/seca (maio), seca (agosto) e transição seca/chuvosa (novembro), nos anos de 2012 e 2013, após tratamento com protocolo longo de sincronização do estro em ovelhas deslanadas. ^{ab} Letras minúsculas indicam diferenças entre os meses em cada ano. ^{AB} Letras maiúsculas indicam diferença entre os anos no mesmo mês.	55
Figura 2	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG em diferentes épocas do ano. Comparação entre anos em cada época (a, b, c, d) e comparação entre épocas com os dados agrupados (e).	56
Figura 3	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG em diferentes épocas do ano. Comparação entre anos em cada época	

(a, b, c, d) e comparação entre épocas com os dados agrupados (e). 57

Capítulo 4

Figura 1 Média (\pm D.P.) da concentração plasmática de estradiol, em cada grupo individualmente ou com os três tratamentos agrupados, em ovelhas ovariectomizadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona novo no dia 0 (-24 h) e 2 mg de estradiol-17 β (\blacklozenge E-17 β ; n = 6), benzoato de estradiol (\blacksquare BE; n = 6) ou cipionato de estradiol (\blacktriangle ECP; n = 6) no Dia 1 (0 h). O pessário vaginal com P4 foi removido no Dia 7 (144 h; Experimento 1). Os asteriscos indicam diferenças entre os grupos ($P \leq 0,001$ ***; $P \leq 0,01$ **; $P \leq 0,05$ *). 77

Figura 2 Média (\pm D.P.) da concentração plasmática de FSH em ovelhas ovariectomizadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona novo no dia 0 (-24 h) e 2 mg de estradiol-17 β (\blacklozenge E-17 β ; n = 6), benzoato de estradiol (\blacksquare BE; n = 6) ou cipionato de estradiol (\blacktriangle ECP; n = 6) no Dia 1 (0 h). O pessário vaginal com P4 foi removido no Dia 7 (144 h; Experimento 1). Os asteriscos indicam diferenças entre os grupos ($P \leq 0,001$ ***; $P \leq 0,01$ **; $P \leq 0,05$ *). 78

Figura 3 Regressão segmentada e pontos de quebra (*) da concentração plasmática de E2 e FSH em ovelhas ovariectomizadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona novo no Dia 0 (-24 h) e 2 mg de (a) estradiol-17 β (E-17 β ; n = 6), (b) benzoato de estradiol (BE; n = 6) ou (c) cipionato de estradiol (ECP; n = 6) no Dia 1 (0 h). O pessário vaginal com P4 foi removido no Dia 7 (144 h; Experimento 1). 80

Figura 4 Identificação individual dos perfis de diâmetro (≥ 3 mm) das estruturas ovarianas (folículos) presentes em cada ovelha (n = 10) durante o protocolo de sincronização, com início no dia em que o dispositivo de progesterona foi inserido (Dia 0) e terminando no dia da regressão do folículo recrutado na nova onda (Experimento 2). A linha tracejada representa o padrão de regressão do maior folículo presente durante o tratamento. A linha contínua representa o padrão de aparecimento, crescimento e regressão do maior folículo que se desenvolveu após o início do tratamento. O painel (a) representa o grupo E-17 β (n = 5); O painel (b) representa o grupo BE (n = 5). 81

Capítulo 5

Figura 1	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4.	102
Figura 2	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4.	102
Figura 3	Média \pm D.P. do diâmetro do maior folículo (A), número de corpos lúteos (B), concentração de progesterona (C) e volume total dos CL (D), em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4 (a,bP < 0,05; *P = 0,07).	103
Capítulo 6		
Figura 1	Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com 300UI.	123
Figura 2	Comportamento da função densidade de probabilidade para momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com 300UI.	123
Figura 3	Taxa de fertilidade em ovelhas deslanadas com estro sincronizado por protocolo de curta duração com emprego de P4 (a; Experimento 2; P > 0,05) em combinação com 250 μ g de cloprostenol sódico e 300 UI de eCG, utilizando dois métodos de inseminação, cervical superficial ou laparoscópica (b; Experimento 3; a,b P < 0,0001).	125

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
Capítulo 2		
Quadro 1	Precipitação total e temperatura média, temperatura máxima, temperatura mínima, umidade relativa média, umidade relativa máxima e umidade relativa mínima. Dados meteorológicos fornecidos pela estação climatológica automática da Fazenda Água Limpa (FAL), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (FAV/UnB) (2012)	28
Capítulo 3		
Quadro 1	Informações meteorológicas dos meses fevereiro, maio, agosto e novembro, nos anos 2012 e 2013, fornecidas pela estação climatológica automática da Fazenda Água Limpa (FAL), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (FAV/UnB), em Brasília-DF, Brasil	50

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Capítulo 2		
Tabela 1	Média \pm D.P. dos momentos do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG ou FSH:LH, nas épocas chuvosa e seca	32
Capítulo 3		
Tabela 1	Média \pm D.P. dos parâmetros foliculares, luteais e hormonais de ovelhas deslanadas, criadas em condições tropicais, submetidas a protocolo longo de sincronização, em diferentes épocas do ano	58
Capítulo 4		
Tabela 1	Efeito da administração de estradiol-17 β (E-17 β), benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (ECP) sobre as características da concentração plasmática de estradiol e FSH (média \pm D.P.) em ovelhas ovariectomizadas sincronizadas com P4	79
Tabela 2	Média (\pm D.P.) das características foliculares e luteais em ovelhas deslanadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona um dia antes do tratamento com 2 mg de estradiol-17 β (E-17 β) ou 2 mg de benzoato de estradiol (BE)	82
Capítulo 5		
Tabela 1	Incidência de estro, momento do início da manifestação do estro (início do estro) e momento da ocorrência da ovulação (ovulação) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4	101
Capítulo 6		
Tabela 1	Incidência de estro, momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com eCG	121
Tabela 2	Média \pm D.P. do diâmetro do maior folículo, número de CL e volume total dos CL em ovelhas deslanadas submetidas a	

protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em
combinação com eCG

124

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

- > – Maior
< – Menor
≥ – Maior ou igual
≤ – Menor ou igual
≈ – Aproximadamente
% – Porcentagem
°C – Graus Celsius
°N – Graus de latitude ou longitude norte
°S – Graus de latitude ou longitude sul
ANOVA – Análise de Variância
Anti-eCG – Anticorpo monoclonal anti-eCG
AW – Classificação de Köppen para o clima com verão chuvoso e inverno seco
BE – benzoato de estradiol
CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal
CIDR – Dispositivo Intravaginal Liberador de Progesterona
CL – Corpo Lúteo
D – Dia
DF – Distrito Federal
D.P. – desvio padrão
E₂ – Estradiol
E-17β – 17β-estradiol
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
EB – Estradiol benzoate
ECP – Cipionato de estradiol
FAL – Fazenda Água Limpa
FAV – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
FGA – Acetato de Fluorogestona
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
h – Horas
IA – Inseminação Artificial
IAC – Inseminação Artificial Cervical
IAL – Inseminação Artificial Intrauterina Laparoscópica
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
LH – Hormônio Luteinizante
kDa – Kilodalton
kg – Quilograma
m – Metros
MAP – Acetato de medroxiprogesterona
MF – Maior folículo presente no ovário
mg – Miligramas
MHz – Mega Hertz
min – Minutos
mL – Mililitros
mm – Milímetro
mm³ – Milímetros cúbicos

MN – Monta Natural
n – Número de amostras
n° – Número
N – Norte
ng – Nanograma
P – Probabilidade de erro
P4 – Progesterona
PGF2 α – Prostaglandina-F2alfa
PGL – Propilenoglicol
Prec – Precipitação total
RIA – Radioimunoensaio
FTAI – Artificial Insemination In Fixed Time
T máx. – Temperatura máxima
T méd. – Temperatura média
T mín. – Temperatura mínima
UI – Unidades Internacionais
UnB – Universidade de Brasília
UR máx. – Umidade relativa máxima
UR méd. – Umidade relativa média
UR mín. – Umidade relativa mínima
V – Volume
VE – Valerato de estradiol
vs – *Versus*

RESUMO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA SINCRONIA DO ESTRO E OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS

Nathalia Hack Moreira¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, Brasília-DF, ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

A inseminação artificial é uma poderosa ferramenta para os programas de melhoramento genético e conservação de raças, porém, é menos difundida em ovinos. Isso ocorre devido aos resultados irregulares e baixos de fertilidade após a sincronização do estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Um dos fatores que pode contribuir para a piora nesse resultado é a assincronia do estro e da ovulação após o tratamento hormonal. Neste estudo objetivou-se avaliar diferentes alternativas para aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização do estro utilizados em programas de IATF em ovinos. Entre as abordagens utilizadas estão (1) o uso de diferentes promotores do desenvolvimento folicular (eCG e FSH:LH) em diferentes épocas do ano (períodos chuvoso e seco); (2) o uso do protocolo longo com MAP em diferentes épocas do ano (períodos chuvoso, seco e transições); (3) o uso do estradiol associado a progesterona (4) o uso de diferentes doses de eCG e momentos de aplicação; e (5) o uso de dois protocolos curtos com diferentes fontes de progesterona (MAP e P4). Em todos os experimentos, diferentes avaliações quanto a manifestação estral, condição folicular, lutea e hormonal foram realizadas para determinar a eficiência das alternativas propostas. Apesar do protocolo longo com MAP apresentar um melhor desempenho na sincronia do estro e/ou ovulação na época seca do que na época chuvosa, os resultados mostraram que esse protocolo não sincroniza eficientemente a ovulação, o que poderia afetar negativamente as taxas de

fertilidade após IATF. A sincronia do estro e ovulação também é prejudicada quando se utiliza 400 UI de eCG, 24 horas antes da remoção do pessário de progesterona. O uso de diferentes fontes de estradiol, em conjunto com a progesterona, auxilia no recrutamento de uma nova onda e padroniza a condição folicular ovariana, portanto essa abordagem pode ser usada em estudos futuros, para atingir essa finalidade. A utilização da progesterona tanto em um protocolo longo, quanto no curto, resulta em uma boa sincronia da ovulação, contudo, o protocolo curto parece apresentar uma maior eficiência em sincronizar o tempo das ovulações. Essa abordagem em um programa de IATF com a utilização de sêmen congelado, não melhora as taxas de fertilidade utilizando a inseminação artificial por via cervical superficial, contudo, quando a inseminação é realizada por via laparoscópica resulta em valores próximos a 70% de taxa de fertilidade.

Palavras chaves: protocolo hormonal, ovulação, fertilidade, inseminação, sêmen congelado.

ABSTRACT

DIFFERENT ALTERNATIVES ASSESSMENT TO IMPROVE EFFICIENCY ESTRUS AND OVULATION SYNCHRONY IN HAIR SHEEP

Nathalia Hack Moreira¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

¹College of Agronomy and Veterinary Medicine - University of Brasilia, DF, ² Embrapa
Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, DF

Artificial insemination is a powerful tool for breeding programs and conservation of breeds, however, it is less widespread in sheep. This is due to irregular and low fertility results after estrus synchronization and fixed-time artificial insemination (FTAI). One of the factors that may contribute to the decline of this result is the asynchrony of estrus and ovulation after hormonal treatment. This study aimed to evaluate different alternatives to increase the efficiency of estrus synchronization protocols used in FTAI programs in sheep. Among the approaches used are (1) the use of different promoters of follicular development (eCG and FSH:LH) in different seasons (rainy and dry); (2) using the long-term protocol with MAP in different seasons (rainy, dry and transitions); (3) the use of estradiol associated with progesterone (4) the use of different doses of eCG and application times; and (5) the use of two short-term protocols with different sources of progesterone (MAP and P4). In all experiments, different assessments of the estrous manifestation, follicular, luteal and hormonal condition were performed to determine the effectiveness of the proposed alternatives. Despite long-term protocol with MAP perform better in synchrony of estrus and/or ovulation in the dry season than in the rainy season, the results showed that this protocol does not effectively synchronize ovulation, which could negatively affect fertility rates after TAI. Synchrony of estrus and

ovulation is also impaired when using 400 UI of eCG 24 hours before removal of progesterone pessaries. The use of different sources of estradiol in combination with progesterone, helps to recruit a new wave and standardizes the ovarian follicular condition, so this approach can be used in future studies to achieve this purpose. The use of progesterone in both a long protocol as in short, results in a good synchronization of ovulation, however, the short protocol seems to have a higher efficiency in synchronizing the time of ovulation. This approach in a FTAI program with frozen semen does not improve fertility rates using superficial cervical artificial insemination, however, when insemination is performed laparoscopically it results in values close to 70% fertility rate.

Keywords: hormonal protocol, ovulation, fertility, insemination, frozen semen.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial em ovinos é uma poderosa ferramenta para os programas de melhoramento genético e para a disseminação de material genético criopreservado. No entanto, essa biotecnologia é menos difundida em ovinos do que nas outras espécies domésticas, como em bovinos. Isso ocorre pela maior dificuldade no uso do sêmen congelado e pelas variadas taxas de fertilidade. Para contornar essa situação, o ideal seria o desenvolvimento e implementação de protocolos de sincronização do estro, que permitam uma ótima sincronia da ovulação, em um curto período de tempo, viabilizando o uso de técnicas de inseminação simples.

O protocolo mais utilizado para a indução do estro sincronizado consiste na associação da progesterona ou progestágeno (Iida et al., 2004; Zeleke et al., 2005) à gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Abecia et al., 2012). Entretanto, embora muitas vezes, sejam obtidos altos índices de fertilidade, existe uma inconsistência nesses resultados (Uribe-Velásquez et al., 2009) o que poderia ser explicado pela baixa sincronia do estro/ovulação nos tratamentos hormonais empregados (Moreira et al., 2014). Vários fatores também podem estar envolvidos na inconsistência desses resultados que poderiam refletir sobre a sincronia da ovulação, como: diferenças no manejo (Silva & Araújo, 2000), a formação de anticorpos anti-eCG após sucessivos usos da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no mesmo animal (Bodin et al., 1997; Roy et al., 1999), a influência racial (Boscos et al., 2002), a fatores ambientais e condição folicular ovariana (Barrett et al., 2004; Zonturlu et al., 2011), a utilização de diferentes protocolos hormonais (Ungerfeld & Rubianes, 2002; Ozyurtlu et al., 2011) e a técnica utilizada na inseminação artificial (Salamon & Maxwell, 1995).

Ao longo das últimas décadas algumas alternativas vêm sendo estudadas e desenvolvidas para aumentar a eficiência da sincronização do estro em ovinos. Além da utilização de diferentes fontes de progesterona (Ungerfeld & Rubianes, 2002; Fleisch et al.,

2012) pode-se destacar o uso de diferentes promotores do desenvolvimento folicular (Boscos et al., 2002; Bicudo et al., 2009; D'souza et al., 2014; Moreira et al., 2014), diferentes tempos de aplicação de eCG (Koyuncu & Alticekic, 2010; Hristova et al., 2011), diferentes épocas do ano (Duggavathi et al., 2004; Reyna et al., 2007), o uso do estradiol associado à progesterona para o recrutamento de uma nova onda folicular (Barrett et al., 2008; Ungerfeld, 2009), diferentes métodos utilizados na inseminação artificial (Anel et al., 2005; Allaoui et al., 2014), entre outras. Porém, apesar dos esforços empregados, os avanços obtidos na sincronização do estro e ovulação, ainda são insuficientes para incrementar a taxa de fertilidade de forma consistente e a demanda por mais pesquisas nesta área ainda é uma realidade.

Para ultrapassar esse obstáculo é preciso um grande entendimento sobre a influência dos diversos fatores que podem afetar os resultados de fertilidade após a inseminação artificial em tempo fixo, entretanto, é necessário que os fatores que afetam o estro, a ovulação e a formação de um corpo lúteo funcional, durante os protocolos de sincronização do estro, sejam controlados primariamente. Poucos dados estão disponíveis sobre o desempenho de protocolos de sincronização do estro em ovinos deslanados da raça, criados em condições tropicais, com relação à época do ano, à utilização de diferentes promotores do desenvolvimento folicular, à dose ideal de eCG e momentos de sua aplicação, à utilização de hormônios que causem o recrutamento de uma nova onda folicular e ao uso de diferentes fontes de progesterona no protocolo de sincronização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar alternativas para aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização do estro utilizados em programas de inseminação artificial em tempo fixo em ovinos, considerando-se os efeitos da época do ano.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da época chuvosa e seca sobre a fisiologia do ciclo estral de ovelhas sincronizadas com o protocolo longo.
2. Avaliar o desempenho do FSH:LH como alternativa ao eCG em protocolo de sincronização do estro de ovelhas nas épocas chuvosa, seca e transições.
3. Avaliar as doses de 300 ou 400 UI de eCG e a sua aplicação 24 horas antes ou no momento da remoção da progesterona, sobre a indução e sincronia do estro e da ovulação
4. Avaliar os efeitos do estradiol-17 β , benzoato de estradiol e cipionato de estradiol sobre a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) e dinâmica folicular ovariana em ovinos deslanados.
5. Avaliar o efeito da progesterona ou do acetato de medroxyprogesterona sobre a sincronia do estro e ovulação; e avaliar o efeito de dois momentos de inseminação artificial por via cervical superficial sobre a fertilidade em ovelhas com sêmen congelado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ciclo estral

Compreender o padrão de ciclo estral é um passo importante para o desenvolvimento de técnicas que maximizem a fertilidade em ovelhas. O padrão da função reprodutiva da ovelha é determinado por dois ritmos distintos. O primeiro deles é o ciclo estral, que ocorre de forma constante a cada 16 a 17 dias em média, com 95% de ovelhas apresentando ciclos normais dentro de uma faixa de 14 a 19 dias. O segundo é o ciclo sazonal de atividade ovariana, que na maioria das raças de ovinos, se iniciam no final do verão ou início do outono (estação reprodutiva), seguido por um período anovulatório que abrange o final da primavera até meados do verão (anestro estacional) (Evans, 2003; Goodman & Inskeep, 2006; Abecia et al., 2011).

3.1.1 Sazonalidade reprodutiva

A estacionalidade reprodutiva, como parte de um processo de seleção natural, é um mecanismo de adaptação desenvolvido por alguns mamíferos como estratégia para minimizar o impacto negativo do ambiente (temperatura, umidade e disponibilidade de alimentos) sobre a sobrevivência de suas crias, de forma que os nascimentos ocorram nas épocas mais favoráveis do ano, com abundância de pastos e temperatura ambiental confortável (Williams & Helliwell, 1993; Malpoux et al., 1996; Bicudo et al., 2009). O fotoperíodo é o fator determinante da sazonalidade reprodutiva, no entanto, existem outros fatores que modulam esse

padrão de comportamento, assim como, as condições ambientais, o comportamento social e a raça (Williams & Helliwell, 1993; Rosa & Bryant, 2003; Delgadillo et al., 2009; Macias-Cruz et al., 2013). A origem da raça determina o comportamento reprodutivo estacional, portanto, as raças originadas em latitudes altas ($>35^\circ$) apresentam uma estacionalidade reprodutiva marcante, e as ovelhas de origem mediterrânea ou equatorial, expressam uma estacionalidade reprodutiva reduzida e em algumas ocasiões inexistente (Malpaux et al., 1996; Goodman & Inskoop, 2006; Bicudo et al., 2009).

Nesse contexto, ovelhas Suffolk, mesmo em baixas latitudes (19°N), possuem períodos de anestro sazonal associado às mudanças anuais de fotoperíodo. Entretanto, algumas raças, assim como a Pelibuey, criada em regiões do México com a mesma latitude, podem apresentar três modelos de resposta ao fotoperíodo. No primeiro, estão incluídas aproximadamente 40% de ovelhas que são sensíveis às pequenas modificações no fotoperíodo; no segundo, 60% das fêmeas são insensíveis às variações na amplitude do fotoperíodo equatorial e ovulam o ano todo; e terceiro, formado por algumas ovelhas extremamente insensíveis ao fotoperíodo, mantendo sua atividade reprodutiva mesmo quando expostas a fotoperíodos característicos de altas latitudes ($> 35^\circ$) (Arroyo et al., 2007).

Duas hipóteses poderiam explicar esses três padrões distintos de mecanismos fisiológicos para raças locais sob latitude tropical: ou as fêmeas são insensíveis ao fotoperíodo, ou as alterações no fotoperíodo são pequenas demais para afetar a fisiologia das fêmeas (Chemineau et al., 2004).

No Brasil, os rebanhos são compostos por raças europeias e raças localmente adaptadas, lanadas ou deslanadas. A raça Santa Inês, que é adaptada ao nordeste brasileiro, foi formada a partir do cruzamento entre a raça Bergamacia (lanada) e a raça Morada Nova (deslanada), possui boas taxas reprodutivas e não possui anestro estacional nessa região (Silva et al., 1987). A característica de fertilidade ao longo do ano, nessa raça, despertou interesse em vários pesquisadores em diferentes regiões brasileiras, sobre o seu comportamento reprodutivo.

Nesses trabalhos foi observado que a raça Santa Inês além de apresentar variações individuais do comportamento estral ou da atividade hormonal e ovariana, a medida que a latitude aumenta, esses animais passam a exibir variações sazonais no padrão de comportamento estral, podendo ser observado desde alterações nas taxas de ovulações (Silva et al., 1987), presença de ciclos estrais irregulares (curtos, longos e múltiplos), ovulações silenciosas (Sasa et al., 2002; Rodrigues et al., 2007) até períodos de anestro sazonal (Sasa, 2006; Moraes et al., 2013; Balaro et al., 2014).

3.1.2 Comportamento de estro

Quando abordada por um carneiro, a ovelha em estro se mantém parada com a cabeça abaixada. Muitas vezes ela abana o rabo e olha por cima do ombro ao estímulo do carneiro na região do flanco ou na região anogenital. No auge do estro, a ovelha pode procurar ativamente um carneiro. O comportamento de cômte é geralmente seguido por monta e cópula. Em geral, o comportamento de estro dura 24 a 36 horas, embora a sua duração possa ser superior em aproximadamente 50% em raças altamente prolíferas (Goodman & Inskoop, 2006).

O início do estro é correlacionado com um aumento repentino de hormônio luteinizante (LH) pré-ovulatório, de modo que, a(s) ovulação(ões) ocorre(m) em média de 24 a 30 horas após o início do comportamento de estro. Por causa dessa correlação, o início do estro é normalmente utilizado como um marcador para cronometrar os eventos do ciclo estral ovino (Goodman & Inskoop, 2006).

3.1.3 Dinâmica folicular ovariana

A manipulação da reprodução depende frequentemente do controle do desenvolvimento folicular. A necessidade deste conhecimento tem impulsionado investigações para melhor compreender o padrão de desenvolvimento folicular no ovário, e em particular, assimilar as relações estabelecidas entre os folículos que se desenvolvem, em um mesmo período, nos ovários (Evans et al., 2000).

Na ovelha, o desenvolvimento de folículos antrais ovarianos ocorre em um padrão de onda (Ravindra et al., 1994; Evans et al., 2000; Seekallu et al., 2010; Toosi et al., 2010). O desenvolvimento folicular de cada onda é precedido por um aumento nas concentrações séricas do hormônio folículo estimulante (FSH) (Evans et al., 2000; Duggavathi et al., 2003), com duração de 3 a 4 dias, com o pico de FSH ocorrendo dentro de 24 h da emergência da onda (Ginther et al., 1995; Driancourt, 2001).

O intervalo médio inter-onda é de 3 a 5 dias, com três ou quatro ondas foliculares no intervalo interovulatório em ovelhas cíclicas (Ravindra et al., 1994; Ginther et al., 1995). Uma onda folicular é determinada pelo crescimento sincronizado de um grupo de folículos (emergência), seguido por um ou mais folículos que continuam a crescer (folículos

dominantes), enquanto outros regredem (folículos subordinados) (Evans et al., 2000). Um a três folículos antrais ovarianos emergem ou crescem a partir de um pool de folículos pequenos (1 a 3 mm de diâmetro), atingindo diâmetro de ≥ 5 mm antes de regressão ou da ovulação (Evans et al., 2000; Driancourt, 2001).

A dominância folicular em ovinos não é bem estabelecida. Sabe-se que o número de folículos pequenos ou médios permanecem estáveis ao redor dos dias da emergência da onda (Duggavathi et al., 2003). Além disso, conjectura-se que o folículo pré-ovulatório exerce domínio sobre outros folículos durante a fase folicular, uma vez que, o maior folículo se desenvolve e os subordinados são inibidos e entram em atresia (Ravindra et al., 1994; Evans et al., 2000; Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Mas o mesmo efeito não acontece sobre o crescimento folicular da onda subsequente, pois uma nova onda folicular pode surgir mesmo na presença de um folículo grande da onda anterior que parou de crescer ou que se encontra ao final da fase estática (Bartlewski et al., 1999; Evans et al., 2000; Flynn et al., 2000).

As concentrações séricas de estradiol também aumentam concomitantemente com o crescimento dos folículos em cada onda, com um pico ocorrendo por volta do final da fase de crescimento do maior folículo (Driancourt, 2001), entretanto, em comparação com as outras ondas, a ovulatória é a que possui as maiores concentrações de estradiol, devido a um aumento na frequência de pulsos de LH durante o final da fase lútea, que estimula a produção de estrógeno (Toosi et al., 2010). O estradiol e a inibina regulam a secreção de FSH na ovelha através de mecanismos de *feedback* negativo (Palermo, 2007). Durante a fase lútea, a progesterona bloqueia a estimulação de liberação do pico pré-ovulatório de LH pelo estradiol nas ondas antecedentes à pré-ovulatória (Toosi et al., 2010).

As concentrações de progesterona (P4) são geralmente indetectáveis no início do ciclo e, em seguida, sobem gradualmente entre 2 a 8 dias para atingir concentrações máximas de 1,5 a 3 ng/mL, dependendo da raça. As concentrações de P4 permanecem relativamente constantes entre os dias 8 a 14 e, em seguida, caem rapidamente para concentrações normalmente indetectáveis nos próximos 1 a 2 dias (Goodman & Inskeep, 2006). Este padrão de concentrações de P4 é notavelmente constante entre as raças. No entanto, raças mais prolíferas podem apresentar concentrações ligeiramente mais elevadas do que raças com baixas taxas de ovulação (Bartlewski et al., 1999). O período do ano também pode influenciar na concentração de progesterona, sendo observados maiores concentrações no meio da estação reprodutiva, do que no início e final da mesma (Goodman & Inskeep, 2006; Balaro et al., 2014).

3.2 Protocolos hormonais

A reprodução dos pequenos ruminantes pode ser controlada por diversos métodos desenvolvidos nas últimas décadas. Alguns destes envolvem a administração de hormônios que modificam a cadeia fisiológica de acontecimentos envolvidos no ciclo estral. Outros não incluem os hormônios, mas apenas "métodos naturais", tais como controle de luz ou exposição ao macho (Bicudo et al., 2009; Abecia et al., 2011; 2012).

Em ovinos, as modificações da cadeia fisiológica do ciclo estral envolvem a sincronização do estro através de uma redução na duração da fase lútea do ciclo estral por meio da utilização da prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) ou através do prolongamento artificial do ciclo estral com P4 exógena ou com progestágenos (Abecia et al., 2011; Amiridis & Cseh, 2012).

3.3 Alternativas para aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização do estro ovino

3.3.1 Progesterona e análogos (progestágenos)

Métodos que utilizam a progesterona ou seus análogos pela administração exógena são baseados nos efeitos sobre a fase luteal do ciclo, simulando a ação da progesterona natural (Abecia et al., 2011; 2012). Assim, o controle da duração do corpo lúteo ou a manipulação das concentrações circulantes de progesterona permitem bloquear o estro e a ovulação, devido ao seu efeito de *feedback* negativo sobre a secreção de LH. Após a remoção de dispositivos contendo progestágeno/progesterona exógenos, esse efeito é revertido de forma que há o surgimento do pico pré-ovulatório de LH e a ovulação ocorre quase de maneira controlada, sincronizando o estro e ovulação (revisado por [Amiridis & Cseh, 2012]).

O protocolo mais amplamente utilizado na sincronização do estro em ovelhas baseia-se no tratamento longo (12 a 14 dias) com progestágeno/progesterona sob a forma de implantes intravaginais (esponjas/CIDR) ou de implantes subcutâneos (revisado por [Uribe-Velásquez et al., 2009; Abecia et al., 2011]). Assim, vários protocolos vêm sendo testados ao longo dos anos para avaliar a eficácia no uso de diferentes fontes de progesterona (Ungerfeld

& Rubianes, 2002; Zeleke et al., 2005; Safdarian et al., 2006; Fleisch et al., 2012), diferentes durações de tratamento (Vinoles et al., 2001; Ungerfeld & Rubianes, 2002; Fleisch et al., 2012; Teixeira et al., 2016) e diferentes doses (Greyling et al., 1994; Simonetti et al., 2000). Muitos desses protocolos têm sido efetivos em seu propósito, no entanto, ao se fazer um estudo aprofundado sobre eles, pode se observar uma ampla variação de resposta que muitas vezes está associado a baixas taxas de fertilidade.

Duas hipóteses poderiam explicar essa baixa taxa de fertilidade nas ovelhas. A primeira está associada ao estabelecimento de altas concentrações de progesterona, em que, a utilização dos progestágenos, reduz a secreção de LH, ocasionando em alterações no padrão de desenvolvimento folicular, com modificações no efeito de dominância, atresia e volume folicular (Noel et al., 1994; Leyva et al., 1998), uma vez que, o LH é necessário para a maturação final de folículos pré-ovulatórios (Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Além disso, a menor qualidade desses folículos após o tratamento com progestágenos resulta em corpos lúteos morfologicamente normais, porém com baixa produção de progesterona (Letelier et al., 2011). Esses efeitos estão relacionados as diferentes condições foliculares ao início do tratamento, e poderiam exercer alguma influência sobre a sincronia do estro e ovulação e subsequente fertilidade (Gonzalez-Bulnes et al., 2005).

A segunda hipótese estaria associada a baixas concentrações de progestágeno na sincronização do estro, que poderia também afetar a fertilidade das ovelhas por este prejudicar o transporte e sobrevivência de espermatozoides, reduzindo o número de ovócitos fecundados (Allison & Robinson, 1970), ou a essas baixas concentrações estender o tempo de vida do folículo ovulatório, fazendo com que o folículo ovulatório liberasse um ovócito envelhecido e com baixa viabilidade (Vinoles et al., 1999).

3.3.2 Promotores do desenvolvimento folicular

As gonadotrofinas são utilizadas em associação a progesterona ou progestágenos, obrigatoriamente para induzir a atividade estral durante o anestro estacional e também de forma opcional durante a estação reprodutiva, a fim de auxiliar na sincronia do estro e ovulação. Para que os eventos pré-ovulatórios ocorram após o tratamento com progesterona ou progestágeno, é necessário que haja uma quantidade suficiente de gonadotrofinas disponíveis, e o aumento endógeno destes hormônios pode ser conseguido através da aplicação

exógena da gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou do hormônio folículo estimulante (FSH) (Boscos et al., 2002; Abecia et al., 2011).

O hormônio mais comumente utilizado para este fim é a eCG, que possui atividades simultâneas de FSH e LH. As doses utilizadas variam entre 250 a 500 UI, dependendo de alguns fatores como: a idade (250-300 UI em cordeiras, 350-500 UI em ovelhas adultas), a estação (400-500 UI durante anestro, 300-350 UI durante a época de reprodução) e a raça (dose mais baixa para as raças prolíferas) (revisado por [Abecia et al., 2012]).

Além da dose mais apropriada, alguns trabalhos buscaram o melhor momento de aplicação do eCG, às 24 horas antes, no momento e 24 horas após a remoção da progesterona/progestágeno (Ali, 2007; Ustuner et al., 2007; Koyuncu & Alticekic, 2010). Valores próximos a 80% foram alcançados por Koyuncu & Alticekic (2010) na taxa de parição, quando o eCG foi aplicado no momento da remoção da progestágeno, enquanto que uma menor prolificidade foi obtida em ovelhas tratadas com eCG às 24 horas após a remoção do progestágeno. Devido à melhor fertilidade e ao menor manejo utilizado, o uso de uma dose de eCG no momento da remoção do progestágeno/progesterona parece ser o mais indicado. No entanto, os referidos autores utilizaram monta natural, o que possibilita com que mesmo com uma maior dispersão das ovulações não acarrete prejuízo na taxa de fertilidade, sendo necessário mais estudos que avaliem a sincronia das ovulações, a fim de verificar se há diferenças reais na resposta, quando se utiliza a eCG em diferentes momentos de aplicação.

Embora a eficácia da utilização da eCG em muitos casos tenha sido comprovada, uma das hipóteses para explicar a variação na resposta de fertilidade ao protocolo padrão utilizado nos programas de sincronização do estro ovino, está relacionado a molécula de eCG possuir um alto potencial imunogênico, ocasionado pela sua origem heteróloga, alto peso molecular (45 kDa) e elevado nível de glicosilação (Combarous et al., 1981; Murphy, 2012).

Alguns autores correlacionaram altos níveis de ligação a anticorpos após consecutivos tratamentos de sincronização utilizando a eCG a efeitos negativos sobre a fertilidade subsequente (Bodin et al., 1997; Roy et al., 1999). Outros autores relatam que repetidas injeções de eCG não induziram a produção de anticorpos e que provavelmente as mudanças sazonais no padrão de atividade ovariana poderiam influenciar na sensibilidade dos ovários às gonadotrofinas (Gherardi & Lindsay, 1980). Devido a presença de relatos controversos na literatura sobre a formação de anticorpos anti-eCG e a influência destes sobre a sincronização do estro, se torna difícil predizer qual a real importância destes achados na sua utilização nas tecnologias de reprodução assistida.

Contudo, a preocupação com a formação de anticorpos e a possibilidade destes estarem interferindo na sincronização do estro, levou alguns pesquisadores a testar a eficácia do FSH (Knights et al., 2001; Boscos et al., 2002) ou da associação do FSH com o LH, em substituição ao eCG após a sincronização com progestágeno/progesterona (Moreira et al., 2014). Embora o FSH e o LH apresentem um menor tempo de meia-vida que o eCG (Murphy, 2012), foi observado que o FSH:LH sincroniza o estro e a ovulação com a mesma eficácia que a eCG (Moreira et al., 2014). Além disso, estes autores também observaram que embora a ação de 20 UI de FSH:LH fosse semelhante à 300 UI de eCG, ocorreu uma ampla dispersão no momento da ocorrência das ovulações em ambos os protocolos testados. Sugerindo que essa alteração poderia afetar as taxas de fertilidade em programas de inseminação artificial, independentemente do tipo de gonadotrofina utilizada.

Além disso, Boscos et al. (2002) também observaram que a eCG e o FSH utilizados nos protocolos poderiam exercer influências diferenciadas na atividade reprodutiva do ciclo estral subsequente ao protocolo, de acordo com a raça utilizada. A raça Berrichon, trabalhada pelos autores por exemplo, apresentou índices reprodutivos mais altos quando se utilizou FSH do que eCG, ocorrendo o inverso na raça Chios.

Alguns dos trabalhos citados acima (Knights et al., 2001; Boscos et al., 2002), que substituíram a eCG pelo FSH, foram feitos utilizando monta natural após a sincronização e não avaliaram a sincronia das ovulações. A hora e sincronia das ovulações são cruciais para avaliar o melhor momento para a realização da IATF, sendo necessário novos estudos que avaliem a eficácia desses protocolos em diferentes regimes, épocas do ano e raças.

3.3.3 Sincronização em diferentes épocas do ano

Devido as modificações no padrão de comportamento reprodutivo entre as raças, alguns autores realizaram trabalhos em diferentes períodos para avaliar a sua influência sobre o desempenho do protocolo hormonal testado (Knights et al., 2001; Barrett et al., 2004; Zeleke et al., 2005; Ataman et al., 2006; Balara et al., 2015; Oliveira et al., 2016). Em ovelhas da raça Western White Face, a sincronização do estro com MAP e eCG melhorou a resposta e sincronia ovulatória na estação não reprodutiva em relação à estação reprodutiva (Barrett et al., 2004). Já em ovelhas da raça Santa Inês, em latitudes de 21-22° Sul, a sincronização do estro, durante diferentes épocas do ano, alterou o momento da ocorrência da ovulação utilizando protocolo

longo com P4 (Oliveira et al., 2016), enquanto o mesmo não foi observado utilizando o protocolo curto com MAP (Balaro et al., 2015). Além disso, nesses estudos, o momento da ocorrência da ovulação foi mais precoce na utilização do protocolo curto do que do protocolo longo. Esses resultados mostram que a época do ano pode interferir, de forma diferenciada, na resposta aos diferentes protocolos de sincronização, e que essas alterações também poderiam estar envolvidas na variabilidade das taxas de fertilidade.

Portanto, o conhecimento sobre o padrão de resposta estral e da dinâmica folicular após a utilização de protocolos de sincronização do estro, nas diferentes raças, em diferentes latitudes e diferentes épocas do ano, é fundamental para a realização de modificações estratégicas nos protocolos hormonais. Esse conhecimento permitiria encontrar a melhor abordagem para a obtenção de uma alta sincronia da ovulação, padronizando um protocolo hormonal para cada raça.

3.3.4 Utilização do estradiol exógeno para o controle da condição folicular ovariana

O estradiol exógeno é amplamente utilizado para sincronizar a emergência da onda folicular e ovulação em programas de sincronização do estro. Esse hormônio potencializa os efeitos da progesterona em vacas (Bo et al., 1994; Bo et al., 1995; Martinez et al., 2005; Mapletoft et al., 2009) e ovelhas (Meikle et al., 2001; Barrett et al., 2008).

O efeito do estrógeno (E2) não depende do estágio do ciclo estral ou da onda folicular em desenvolvimento (Bo et al., 1995). Quando este é administrado na presença de progesterona endógena (CL) ou exógena, provoca a regressão dos folículos dependentes de gonadotrofina, devido a sua ação na diminuição nas concentrações circulantes de FSH e LH (Barrett et al., 2008). A progesterona exógena bloqueia o pico de LH e evita a ovulação do folículo dominante em animais tratados com E2. Após a redução das concentrações plasmáticas do estradiol, ocorre o aumento de FSH, e conseqüentemente, a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (Martinez et al., 2005).

O benzoato de estradiol (Martinez et al., 2005) e o 17- β estradiol (Barrett et al., 2008), por apresentarem menor tempo de meia-vida, induzem, eficazmente, a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular em animais tratados em bovinos e ovinos, respectivamente. Meikle et al. (2001), estudando a ação do 17 β -estradiol em ovelhas durante o anestro, constataram que a utilização de E2 provoca a regressão de folículos grandes,

sincroniza uma nova onda de crescimento folicular, mas não induz a ovulação em ovelhas. O mesmo foi observado por Barrett et al. (2008), porém em seu trabalho, a associação do protocolo com 17β -estradiol e uma aplicação de eCG no momento da remoção do pessário, resultou na indução da ovulação em todos os animais em um período de 72 a 96 horas. Contrariamente, o benzoato de estradiol, na dose de 0,1 e 0,2 mg associado a uma exposição curta (4 dias) de MAP não provocou a sincronia da emergência de uma nova onda folicular, bem como, não melhorou a sincronia do estro ou ovulação (Takada et al., 2012).

Embora existam alguns trabalhos com a utilização do 17β -estradiol, pouco ou nada se sabe sobre o efeito da utilização de altas concentrações de E2 exógeno sobre o padrão de supressão das concentrações plasmáticas de FSH e sobre as alterações na dinâmica folicular ovariana provocadas pela utilização desse hormônio ou de diferentes ésteres de estradiol na sincronização do estro em ovinos. Esse conhecimento permitiria a criação de protocolos com uma alta padronização do status folicular ovariano, e conseqüentemente, em uma maior sincronia da ovulação.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 67-79, Mar 2011.

_____. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 173-179, Feb 2012.

ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, n. 1, p. 33-37, Sep 2007.

ALLAOUI, A. et al. Comparative Study between Ovine Artificial Insemination and Free Mating in Ouled Djellal Breed. **APCBEE Procedia**, v. 8, p. 254-259, 2014.

ALLISON, A. J.; ROBINSON, T. J. The effect of dose level of intravaginal progestagen on sperm transport, fertilization and lambing in the cyclic Merino ewe. **Journal of reproduction and fertility**, v. 22, p. 515-531, 1970.

AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 152-161, Feb 2012.

ANEL, L. et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235-1247, Mar 2005.

ARROYO, L. J. et al. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19 degrees north latitude. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 1-2, p. 24-30, Nov 2007.

ATAMAN, M. B.; AKOZ, M.; AKMAN, O. Induction of synchronized oestrus in akkaraman cross-bred ewes during breeding and anestrus seasons: the use of short-term and long-term progesterone treatments. **Revue De Medecine Veterinaire**, v. 157, n. 5, p. 257-260, May 2006.

- BALARO, M. F. A. et al. Reproductive performance, metabolic and hormonal profiles of Santa Ines ewes in winter and summer under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 3, p. 627-631, Mar 2015.
- BALARO, M. F. A. Is the Santa Ines sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 8, p. 1533-1537, Dec 2014.
- BARRETT, D. M. W. et al. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, Apr 2008.
- BARRETT, D. M. W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 311-327, Jan 2004.
- BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 111-124, Jan 1999.
- BICUDO, S. D. et al. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 167-181, 2009.
- BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, Jan 1995.
- BO, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17-beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, Jun 1994.
- BODIN, L. et al. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 37, n. 6, p. 651-660, Nov-Dec 1997.
- BOSCOS, C. M. et al. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1261-1272, Oct 2002.
- CHEMINEAU, P. et al. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. **BMC Physiology**, v. 4, p. 12-12, 2004.
- COMBARNOUS, Y.; SALESSE, R.; GARNIER, J. Physicochemical properties of pregnant mare serum gonadotropin. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 667, n. 2, p. 267-276, 1981.
- DELGADILLO, J. A. et al. The 'male effect' in sheep and goats—Revisiting the dogmas. **Behavioural Brain Research**, v. 200, n. 2, p.304-314, Jun 2009.
- D'SOUZA, K. N. et al. Gonadotropin stimulation using P.G. 600 (R) on reproductive success of non-lactating anestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 3-4, p. 115-120, Aug 2014.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, Apr 1 2001.

DUGGAVATHI, R. et al. Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine follicle-stimulating hormone during the inter-wave interval. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 821-827, Mar 2004.

DUGGAVATHI, R. et al. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 495-510, Aug 2003.

EVANS, A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 289-306, Oct 15 2003.

EVANS, A. C. O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 699-715, Feb 2000.

FLEISCH, A. et al. Comparison of 6-day progestagen treatment with Chronogest[®] CR and Eazi-breed[™] CIDR[®] G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2-3, p. 141-146, Oct 2012.

FLYNN, J. D. et al. Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 4, p. 285-296, Sep 1 2000.

GHERARDI, P. B.; LINDSAY, D. R. The effect of season on the ovulatory response of merino ewes to serum from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, n. 2, p. 425-429, 1980 1980.

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, n. 3, p. 689-703, Feb 1995.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 107-119, Aug 2004.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2523-2534, Jun 2005.

GOODMAN, R. L.; INSKEEP, E. K. CHAPTER 44 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep A2 - Neill, Jimmy D. In: (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p.2389-2447.

GREYLING, J. P. C. et al. Synchronization of estrus in sheep - use of different doses of progestagen outside the normal breeding-season. **South African Journal of Animal Science-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Veekunde**, v. 24, n. 1, p. 33-37, Mar 1994.

HRISTOVA, T. et al. The influence of the time of implementation of pmsg on some of the reproductive parameters in sheep with synchronized oestrus. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 4, p. 1845-1850, 2011.

IIDA, K. et al. A comparative study of induction of estrus and ovulation by three different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 63-69, Feb 2004.

KNIGHTS, M. et al. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewes. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 5, p. 1120-1131, May 2001.

KOYUNCU, M.; ALTICEKIC, S. O. Effects of Progestagen and Pmsg on Estrous Synchronization and Fertility in Kivircik Ewes during Natural Breeding Season. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 3, p. 308-311, Mar 2010.

LETELIER, C. A. et al. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 1-2, p. 61-69, Jun 2011.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**, v. 50, n. 3, p. 395-416, Aug 1998.

MACIAS-CRUZ, U. et al. Reproductive efficiency of Pelibuey and Romanov x Pelibuey ewes synchronized with synthetic progesterone and low doses of PMSG under a hot environment. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, n. 12, p. 546-553, 2013.

MALPAUX, B. et al. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 109-117, Apr 1996.

MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 114-124, 2009.

MARTINEZ, M. F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, Mar 2005.

MEIKLE, A. et al. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 beta. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 79-90, Jul 2001.

MORAES, G. V. et al. Frequency of estrus in Santa Ines, Texel and Ile de France ewes in the northwest of Parana State, Brazil. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 42, n. 10, p. 706-712, Oct 2013.

MOREIRA, N. H. et al. Utilização de FSH:LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, Jul-Sep 2012.

NOEL, B. et al. Effects of FGA and PMSG on follicular-growth and lh-secretion in suffolk ewes. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 719-727, Feb 1994.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in Santa Ines ewes under subtropical conditions. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 452-460, Feb 2016.

OZYURTLU, N. et al. Effect of subsequent two short-term, short-term, and long-term progestagen treatments on fertility of Awassi ewes out of the breeding season. **Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 58, n. 2, p. 105-109, 2011.

PALERMO, R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 15, n. 3, p. 326-337, Sep 2007.

RAVINDRA, I. P. et al. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous-cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 2, p. 501-509, Jul 1994.

REYNA, J. et al. Synchrony of ovulation and follicular dynamics in merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 410-417, Aug 2007.

RODRIGUES, P. D. et al. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under subtropical conditions. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 5, p. 468-475, Sep-Oct 2007.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 3, p. 155-171, Jun 2003.

ROY, F. et al. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 209-218, Jul 1999.

SAFDARIAN, M.; KAFI, M.; HASHEMI, M. Reproductive performance of Karakul ewes following different oestrous synchronisation treatments outside the natural breeding season. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, n. 4, p. 229-234, 2006.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. 2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1-2, p. 1-36, Mar 1995.

SASA, A. **Perfis sazonais das concentrações plasmáticas de progesterona, prolactina e melatonina de ovelhas criadas em baixas latitudes**. 2006. 50p. (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

- SASA, A. et al. Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Borregas Lanadas e Deslanadas no Período de Abril a Novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1150-1156, 2002.
- SEEKALLU, S. V. et al. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 670-680, Mar 2010.
- SILVA, A. E. D. F. et al. Efeito do manejo nutricional sobre a taxa de ovulação e de folículos, no decorrer do ano, em ovinos deslanados no nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 635-645, 1987.
- SILVA, F. L. R.; ARAÚJO, A. M. Características de reprodução e de crescimento de ovinos mestiços Santa Inês, no Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1712-1720, 2000.
- SIMONETTI, L.; BLANCO, M. R.; GARDON, J. C. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. **Small Ruminant Research**, v. 38, n. 3, p. 243-247, Nov 2000.
- TAKADA, L. et al. Ovarian response of Suffolk ewes to estrous synchronization using short-term protocol. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 314-319, Feb 2012.
- TEXEIRA, T. A. et al. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v.48, n. 3, p. 545-551, Mar 2016.
- TOOSI, B. M. et al. Characteristics of peaks in serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 73, n. 9, p. 1192-1201, Jun 2010.
- UNGERFELD, R. The induction of oestrus in ewes during the non-breeding season using pre-used CIDRs and oestradiol-17 beta treatment. **Small Ruminant Research**, v. 84, n. 1-3, p. 129-131, Jun 2009.
- UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 1, p. 63-66, Oct 2002.
- URIBE-VELÁSQUEZ, L. F. et al. Respostas foliculares e endócrinas em ovelhas após sincronização do estro usando progesterona, prostaglandinas (PGF2 α) e gonadotrofinas. **Veterinária e zootecnia**, v. 3, n. 2, p. 14-27, 2009.
- USTUNER, B. et al. Effects of long and short-term progestagen treatments combined with PMSG on oestrus synchronization and fertility in awassi ewes during the breeding season. **Acta Veterinaria Brno**, v. 76, n. 3, p. 391-397, Sep 2007.

VINOLES, C. et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 993-1004, Mar 2001.

VINOLES, C. et al. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1351-1361, May 1999.

WILLIAMS, L. M.; HELLIWELL, R. J. A. Melatonin and seasonality in the sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 159-182, Oct 1993.

ZELEKE, M. et al. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, v. 56, n. 1-3, p. 47-53, Jan 2005.

ZONTURLU, A. K.; OZYURLU, N.; KACAR, C. Effect of Different Doses PMSG on Estrus Synchronization and Fertility in Awassi Ewes Synchronized with Progesterone During the Transition Period. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 17, n. 1, p. 125-129, 2011.

CAPÍTULO 2

**SINCRONIA DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS SOB
CONDIÇÕES TROPICAIS, NA ÉPOCA CHUVOSA E SECA, UTILIZANDO
PROTOCOLO LONGO COM eCG OU FSH:LH**

1 RESUMO

A influência da estação do ano (chuva e seca) e de diferentes promotores de crescimento folicular (eCG e FSH:LH) foi avaliada quanto ao desenvolvimento folicular e sincronia do estro e da ovulação em ovelhas deslanadas (n = 12), sincronizadas com MAP por 12 dias e mantidas em 15° de latitude sul, sob condições tropicais. Tanto o eCG quanto o FSH:LH foram eficientes em induzir o estro, a ovulação e a formação de pelo menos um corpo lúteo funcional. Na época seca houve redução no número de folículos ovulados no FSH:LH e a sincronização do comportamento de estro com ambos os hormônios utilizados. Entretanto, ambos os protocolos não sincronizaram, de forma eficiente, o estro e a ovulação em ovelhas deslanadas, nas duas épocas estudadas.

Palavras chave: MAP, ovino, sincronização do estro, fertilidade, inseminação artificial

2 ABSTRACT

The seasonal influence (rainy and dry) and different follicular promoters (eCG and FSH:LH) was evaluated to assess follicular development and synchronization of estrus and ovulation in hair sheep (n = 12), synchronized with MAP for 12 days and maintained at 15 ° south latitude, under tropical conditions. Both eCG as FSH:LH were effective in inducing estrus and ovulation, and produced at least a functional corpus luteum. In the dry season there was a reduction in the number of ovulated follicles in FSH:LH and improved synchronization of estrus behavior with both hormones used. However, both protocols did not efficiently synchronize estrus and ovulation in hair sheep in both studied seasons.

Keywords: MAP, sheep, estrous synchronization, fertility, artificial insemination

3 INTRODUÇÃO

A sincronização do estro é aplicada no manejo reprodutivo de rebanhos ovinos em todo o mundo. O protocolo de sincronização mais utilizado, baseia-se no tratamento longo com progestágeno (acetato de medroxiprogesterona - MAP, acetato de fluorogestona - FGA)/progesterona (P4) associados à gonadotrofina coriônica equina (eCG) (revisado por [Abecia et al., 2012; Amiridis & Cseh, 2012; Souza, 2013]). O uso desse protocolo propicia altas taxas de fertilidade, prolificidade e fecundidade (Macias-Cruz et al., 2013). No entanto, o uso sucessivo de protocolos que utilizam a eCG pode levar à formação de anticorpos anti-eCG, resultando na refratariedade ao tratamento de sincronização e conseqüentemente redução nas taxas de fertilidade (Bodin et al., 1997).

A fim de evitar os efeitos adversos ocasionados pela molécula de eCG, Boscos et al. (2002) avaliaram a indução da manifestação de estro e fertilidade, durante a metade da estação reprodutiva, com uma aplicação de 10 UI de FSH no fim do tratamento com progestágeno, resultando em fertilidade semelhante ao protocolo com a eCG. Em outro estudo realizado no fim do inverno em ovelha Santa Inês, a utilização da associação FSH:LH em substituição à eCG apresentou similaridade quanto a sincronia do estro e ovulação, taxa de ovulação, tamanho do folículo ovulatório, volume da massa luteal e concentração de progesterona (Moreira et al., 2014).

Além do tipo de gonadotrofina utilizada, a estação do ano em que o protocolo é realizado pode influenciar no grau de sincronia do estro e ovulação. Barrett et al. (2004) relataram que no protocolo com a associação de progesterona e eCG, a duração da fase de crescimento folicular até a ovulação é significativamente menor durante o anestro estacional do que na estação reprodutiva. Além disso, o estro e as ovulações parecem acontecer de forma mais sincronizada nesse período quando se utiliza protocolos de indução/sincronização do estro. Entretanto, o padrão de ciclicidade de ovinos em clima tropical parece ser diferente do

relatado em clima temperado (Oliveira et al., 2016), principalmente quando raças localmente adaptadas estão envolvidas (Arroyo et al., 2007; Balaro et al., 2014).

A raça Santa Inês, que é adaptada ao clima semiárido brasileiro, possui altas taxas de fertilidade e não possui anestro estacional nessa região (Silva et al., 1987). No entanto, à medida que a latitude aumenta, esses animais passam a exibir alterações no padrão do ciclo estral, podendo ser observado presença de ciclos estrais irregulares e ovulações silenciosas (Sasa et al., 2002; Rodrigues et al., 2007). Essa mudança no padrão do comportamento estral em diferentes localidades, ao longo do ano, pode ocasionar em modificações na resposta da sincronização do estro e da ovulação.

Nas condições tropicais brasileiras existem poucos estudos que avaliem a resposta aos protocolos de sincronização em diferentes épocas do ano em ovinos. Hipotetizou-se que a época do ano pode alterar o padrão de desenvolvimento folicular e com isso influenciar na resposta aos protocolos de sincronização do estro e da ovulação utilizando a associação de MAP e eCG ou FSH:LH. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito do FSH:LH e do eCG sobre a dinâmica folicular, sincronia do estro e da ovulação em ovelhas deslanadas criadas em condições tropicais, na época chuvosa e seca.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Protocolo CEUA- UnBDOC nº. 116278/2011)

4.1 Animais e delineamento experimental

O experimento foi realizado nos meses de fevereiro (época chuvosa) e agosto (época seca) de 2012, em Brasília, DF, Brasil, localizado a 15°47' de latitude sul e 47°55' de longitude oeste, 1080m de altitude, de clima tropical. O clima da região é caracterizado por verão chuvoso e inverno seco, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013), com a precipitação, temperatura, umidade e duração do dia, dos meses de fevereiro e agosto, descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Precipitação total e temperatura média, temperatura máxima, temperatura mínima, umidade relativa média, umidade relativa máxima e umidade relativa mínima. Dados meteorológicos fornecidos pela estação climatológica automática da Fazenda Água Limpa (FAL), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (FAV/UnB) (2012)

Mês	Prec. mm	T méd. °C	T máx. °C	T mín. °C	UR méd. %	UR máx. %	UR mín. %
Fev	196,4	20,8	27,8	15,2	80,0	98,2	49,3
Ago	0,0	18,6	26,9	10,2	56,4	86,1	30,0

Prec. – precipitação total; T med. – temperatura média; T máx. – temperatura máxima; T mín. – temperatura mínima; UR med. – umidade relativa média; UR máx. – umidade relativa máxima; UR min. – umidade relativa mínima.

Foram utilizadas 48 ovelhas deslanadas da raça Santa Inês, híginas, com idade entre 2 e 5 anos, peso médio de $45,7 \pm 7,4$ kg e escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (escala de 1 a 5 [Thompson e Meyer, 1994]). Os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* e no período das avaliações do estro e ovulação, todos os animais foram alocados em baias coletivas recebendo feno de Tifton (*Cynodon sp.*). Em todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e sal mineral. No inverno (época seca) os animais foram suplementados com silagem de milho para manutenção da condição corporal. As ovelhas tiveram o estro sincronizado através da inserção de pessários vaginais impregnados com 60 mg de MAP (Progespon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A), que permaneceram por 12 dias. No momento da retirada do pessário vaginal, as ovelhas foram divididas aleatoriamente (n = 12), para receber 300 UI de eCG (Novormon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A.) ou 20 UI de FSH:LH (Pluset[®], Hertape Calier, Saúde Animal, S.A.) por via intramuscular (MOREIRA et al., 2014). O experimento seguiu um delineamento fatorial 2x2, em que ambos os grupos foram avaliados em dois momentos, correspondentes às épocas chuvosa (fevereiro – verão) e seca (agosto – inverno), formando assim quatro Grupos: eCGChuva; FSH:LHChuva; eCGSeca; FSH:LHSeca.

4.2 Avaliação do estro

Ao final do protocolo as ovelhas foram mantidas na presença de um rufião, que teve a região do externo pintado com uma mistura de óleo e tinta em pó. O estro foi avaliado

em intervalos de quatro horas, por um período de 30 min, sendo consideradas em estro as fêmeas que aceitavam a monta e que estavam marcadas na região da garupa. Foram registrados os seguintes parâmetros: incidência de estro (%), obtido pela razão do número de ovelhas em estro pelo número total de ovelhas do tratamento; momento do início da manifestação do estro sendo o tempo entre a remoção do pessário até o início da manifestação estral; e dispersão do momento do início da manifestação do estro sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado do início da manifestação do estro em cada tratamento.

4.3 Avaliação ultrassonográfica

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas, em cada ovelha, doze horas após o início da manifestação do estro. Os exames ultrassonográficos foram realizados em intervalos de 4 horas usando scanner modo-B em tempo real, Mindray DP-2200Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical, Electronics CO, LTD, China), com transdutor linear multifrequencial adaptado para exame transretal. Todas as imagens foram obtidas na frequência de 7,5MHz.

Os seguintes parâmetros foram registrados: momento da ocorrência da ovulação sendo o tempo entre a remoção do pessário vaginal até a ovulação; dispersão do momento da ocorrência da ovulação sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado da ovulação em cada tratamento; diâmetro do maior folículo obtido pela média das duas maiores diagonais do folículo ovulatório, no momento da avaliação precedente à constatação da ovulação.

O momento da ocorrência da ovulação foi determinado como a média do tempo entre a última avaliação que o folículo ovulatório ($\geq 4\text{mm}$) estava presente e a avaliação em que se verificou o seu desaparecimento. Quando mais de um folículo ovulou em avaliações distintas foi considerado o momento da ovulação do primeiro folículo ovulado. Somente foram consideradas responsivas ao tratamento as ovelhas que manifestaram estro e ovularam no período de 118 horas após a retirada do pessário vaginal.

Sete dias após a ovulação foi realizado um novo exame ultrassonográfico para mensuração do diâmetro luteal (média das duas maiores diagonais do CL). Os seguintes parâmetros foram registrados: número de corpos lúteos; volume total dos corpos lúteos, obtido pela fórmula matemática do volume do cilindro e o volume total obtido pela soma do volume de todos os corpos lúteos presentes nos dois ovários.

4.4 Dosagem hormonal

No dia da avaliação do CL, antes das avaliações ultrassonográficas, foram realizadas coletas de sangue para a mensuração da concentração sérica de progesterona. O sangue foi coletado por venopunção jugular, em tubos à vácuo sem anticoagulante, sendo posteriormente centrifugados. Logo após, o soro foi aspirado e estocado em microtubos de 2,0 mL e armazenado a -20°C até a análise. As concentrações séricas de progesterona (P4) foram mensuradas por radioimunoensaio (RIA), utilizando kits comerciais (Coat-a-Count, DPC, Diagnostic Products Co, Los Angeles, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio foi de 4,6%.

4.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team 2013). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (D.P.) ou porcentagem, sendo considerados significativos quando $P \leq 0,05$ e como tendência quando $0,06 \leq P \leq 0,10$. Devido à instabilidade das variáveis estudadas, todas as variáveis foram submetidas a análises visuais para avaliar a homocedasticidade (boxplot) e a normalidade (hist, plot-density, qqnorm e qqline), sendo comprovadas pelo teste de Bartlett (bartlett.test) e de Shapiro-Wilk (shapiro.test), respectivamente.

Devido ao comportamento da maioria dos dados não se adequar ao de uma distribuição normal, aderiu-se a utilização de modelos lineares generalizados (glm). A adequabilidade da distribuição utilizada em cada variável foi analisada através dos gráficos de envelopes simulados para os resíduos, utilizando-se a função de ligação em que os dados se adequaram melhor. Após o ajuste do modelo, foi utilizada uma análise de desvio (anova) para interpretação quanto à significância dos resultados.

Somente a variável “número de corpos lúteos” apresentou interação entre o tratamento e a época, e por este motivo as diferenças foram analisadas por um teste de contraste t-test (contrast). As variáveis que não apresentaram interação entre o tratamento e a época, e que apresentaram uma influência separadamente do tratamento ou da época, foram agrupadas

em cada categoria para análise. A incidência de estro foi avaliada pelo teste exato de Fisher (fisher.test). A dispersão do momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação foi analisada com o teste F na razão de variâncias (var.test) combinado com análise gráfica das distribuições de densidades (density).

5 RESULTADOS

Todas as ovelhas deste estudo foram detectadas em estro, porém somente foram consideradas responsivas aos tratamentos e utilizadas para análise estatística, àquelas que manifestaram estro e ovularam dentro de 118 horas após a remoção do progestágeno. Os animais considerados responsivos iniciaram a manifestação dos sinais clínicos de estro entre 31 e 86 h e ovularam entre 56 e 116 horas. Após a remoção da P4, a taxa global da incidência de estro foi de 93,75% ($P > 0,05$). O FSH:LH atrasou o momento do início da manifestação do estro ($P = 0,05$) e tendeu a atrasar o momento da ocorrência da para a ovulação ($P = 0,07$) em relação ao eCG (Tabela 1). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para o intervalo de tempo estro/ovulação, sendo a média de $30,17 \pm 6,4$.

Tabela 1. Média \pm D.P. dos momentos do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG ou FSH:LH, nas épocas chuvosa e seca

Variável	Tratamento	
	eCG	FSH:LH
Momento do início da manifestação do estro (h)	$45,8 \pm 12,4^a$	$53,8 \pm 13,6^b$
Momento da ocorrência da ovulação (h)	$75,9 \pm 12,2^*$	$84,0 \pm 16,3^*$

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P = 0,05$)

* Tendência para o efeito do hormônio ($P = 0,07$)

O intervalo para o momento do início da manifestação do estro variou em 50,2 h no grupo eCGChuva e em 55 h no grupo FSH:LHChuva, e essa variação foi de 28,7 h e 21,9 h para os grupos eCGSeca e FSH:LHSeca, respectivamente. A época seca concentrou mais a manifestação do estro quando utilizado o hormônio FSH:LH ($P = 0,01$) e tendeu a concentrar

quanto utilizado o hormônio eCG ($P = 0,10$; Figura 1a, b) em relação à época chuvosa. Não houve diferença na dispersão do momento do início da manifestação do estro ($P > 0,05$) entre os dois tratamentos na mesma época do ano (Figura 1c, d).

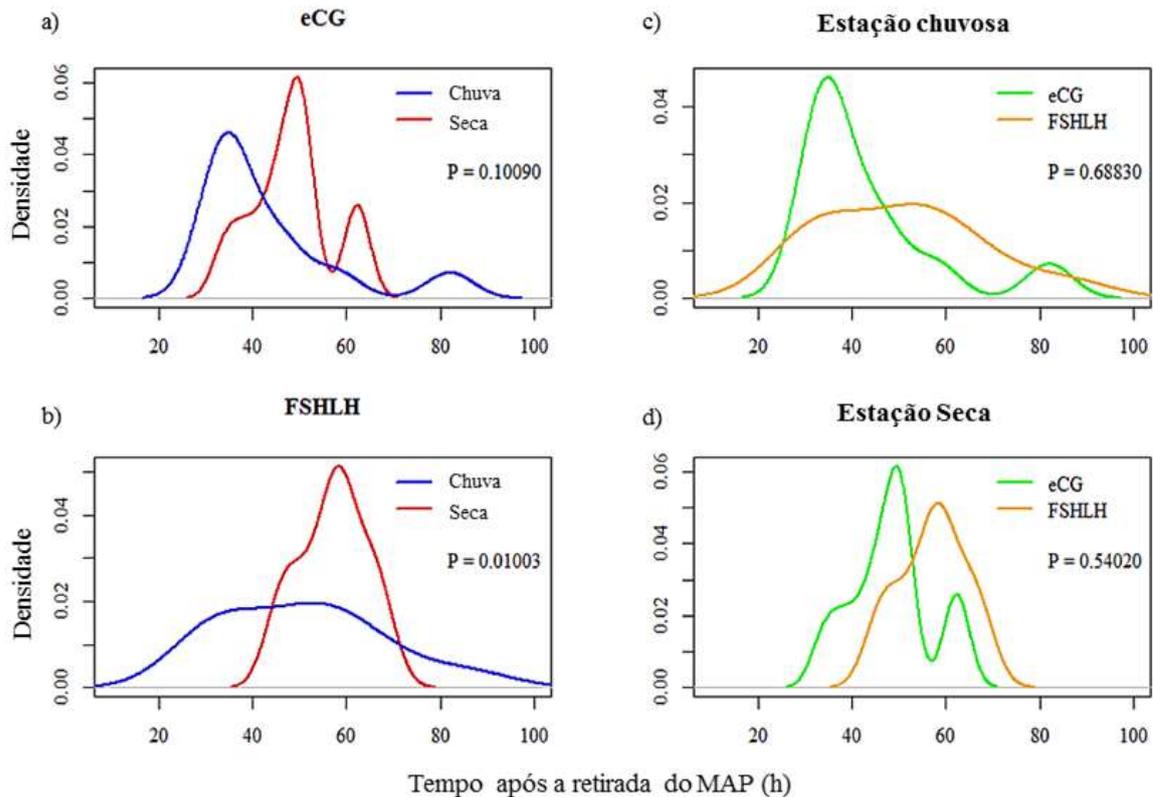


Figura 1. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG (a) ou FSH:LH (b), nas épocas chuvosa (c) ou seca (d).

O momento da ocorrência da ovulação variou em 45,6 h no grupo eCGChuva e em 60,0 h no grupo FSH:LHChuva, e essa variação foi de 28,5 h e 36,0 h para os grupos eCGSeca e FSH:LHSeca, respectivamente. A dispersão na ocorrência da ovulação foi semelhante entre os tratamentos e entre as épocas (Figura 2; $P > 0,05$).

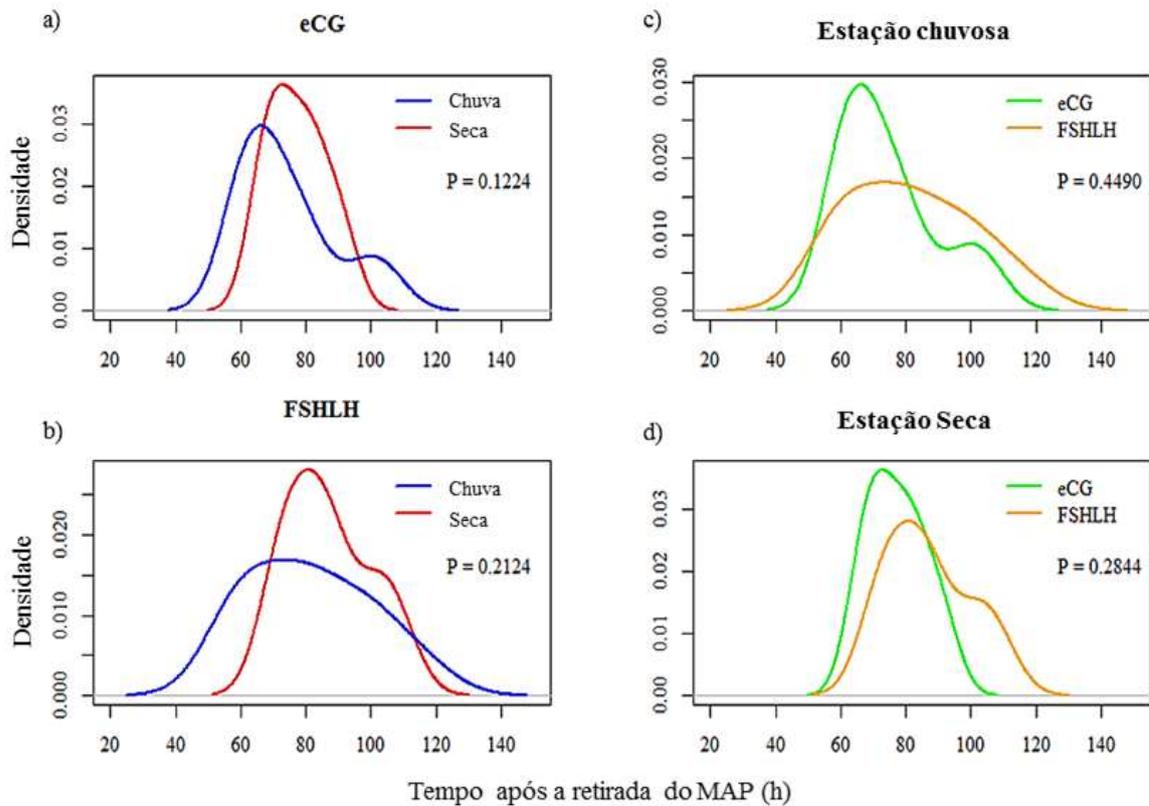


Figura 2. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslançadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG (a) ou FSH:LH (b), nas épocas chuvosa (c) ou seca (d).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos para o diâmetro do maior folículo, apresentando média global de $6,2 \pm 0,6$ mm. O número de corpos lúteos no tratamento com eCG foi semelhante entre as épocas (eCGChuva, $1,5 \pm 0,5$; eCGSeca, $1,6 \pm 0,7$; $P > 0,05$), enquanto, no com FSH:LH houve uma redução na época seca (FSH:LHChuva, $1,8 \pm 0,6$; FSH:LHSeca, $1,0 \pm 0,0$; $P < 0,05$). O volume total dos corpos lúteos foi maior ($P = 0,0009$) no tratamento com eCG (Chuva e Seca; $853,2 \pm 398,8$ mm³) do que no com FSH:LH (Chuva e Seca; $559,9 \pm 186,0$ mm³). A concentração de progesterona foi maior ($P = 0,002$) no tratamento com FSH:LH (Chuva e Seca; $5,3 \pm 1,9$ ng/mL) do que no com eCG (Chuva e Seca; $6,9 \pm 2,5$ ng/mL) (Figura 3).

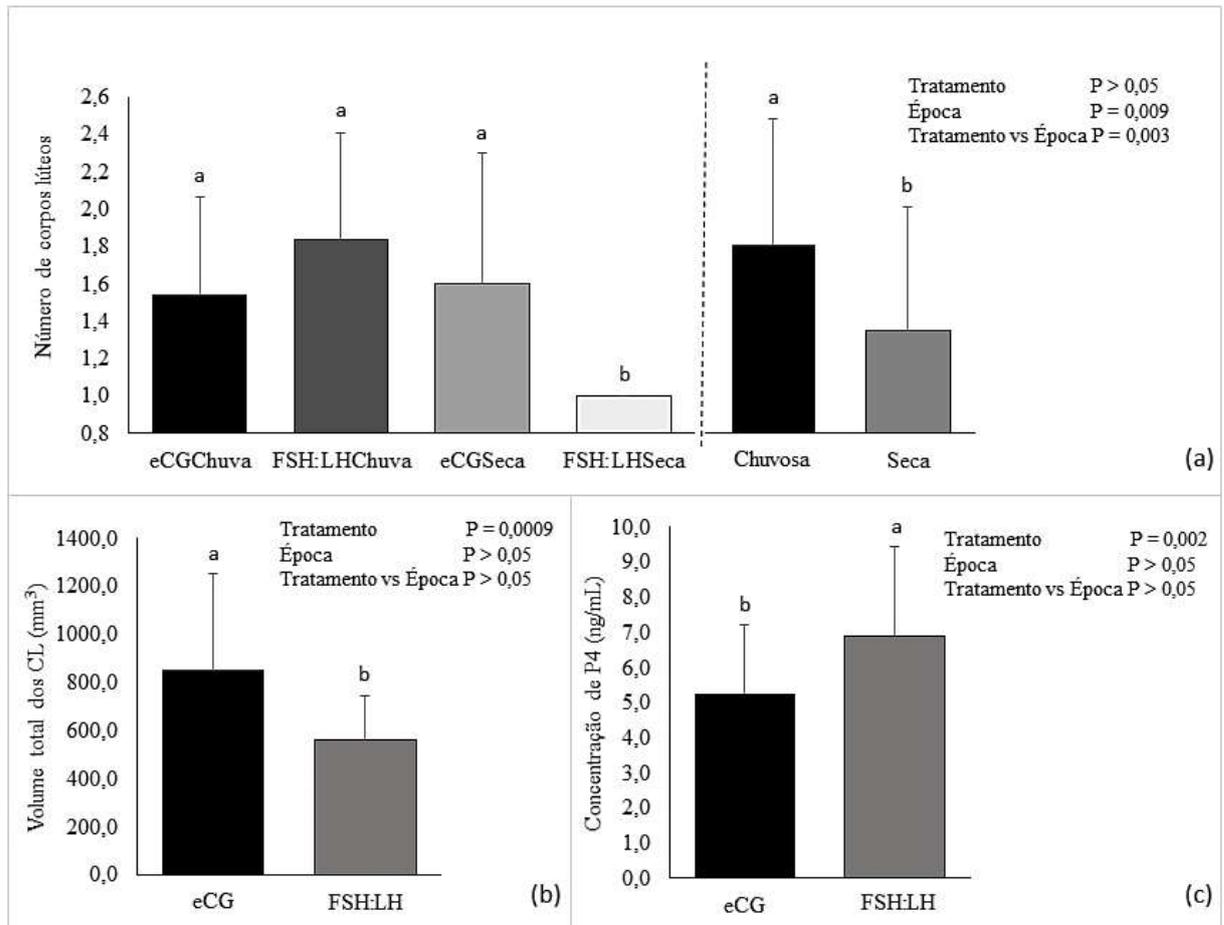


Figura 3. Média \pm D.P. do número de corpos lúteos (a), volume total dos CL (mm³) (b) e concentração de progesterona (ng/mL) (c), em ovelhas deslanadas submetidas a protocolos longos de sincronização utilizando os tratamentos com eCG ou FSH:LH, nas épocas chuvosa e seca.

6 DISCUSSÃO

A melhora na eficiência dos protocolos de sincronização é crucial para o aumento do uso da inseminação artificial na indústria ovina, portanto, o aumento da incidência de estro e ovulação, da sincronia do estro e da ovulação e a ocorrência de ovulação com formação do corpo lúteo funcional são indispensáveis. Esses fatores podem ser influenciados pelo fotoperíodo (Balaro et al., 2014) bem como por alterações climáticas (Hashem et al., 2011). O presente estudo foi conduzido na época chuvosa (verão), no qual, os dias são mais quentes, úmidos e com alta pluviosidade e possui fotoperíodo decrescente e na época seca (inverno), em que, os dias são mais frios, secos e com baixa ou nenhuma pluviosidade e com fotoperíodo crescente (Quadro 1). Nessas condições, ambos os tratamentos foram eficazes em induzir o estro e ovulação em uma alta porcentagem de animais (93,75%) em ambas as estações do ano.

O momento do início da manifestação do estro e o momento da ocorrência da ovulação não foram influenciados pela época do ano, com nenhum dos tratamentos utilizados. Balaro et al. (2015) em 22° de latitude Sul, em ovelhas da raça Santa Inês, não verificaram diferença na manifestação do estro e ovulação nas épocas chuvosa e seca. Entretanto, em 21° de latitude Sul, o protocolo longo com P4 atrasou os momentos de início do estro e ocorrência da ovulação nas épocas chuvosa em relação a transição seca-chuva (Oliveira et al., 2016). Provavelmente a latitude (15° de latitude sul) e as alterações climáticas no período estudado, não provocam uma mudança significativa no crescimento folicular em ovelhas da raça Santa Inês, que ocasione em uma alteração na resposta ao protocolo hormonal empregado. Entretanto, não pode se descartar a influência de outras épocas do ano e/ou protocolos empregados. No presente estudo, apesar de não haver efeito da época, o tipo de gonadotrofina utilizada atrasou o momento do início da manifestação do estro em 8 horas e tendeu a atrasar a ovulação em igual período no tratamento com FSH:LH (Chuva e Seca). Hipotetizou-se que devido ao maior tempo de meia-vida do eCG (eCG \approx 50 horas; Martinuk et al., 1991; FSH \approx 1,8 horas; Fry et

al., 1987) os folículos foram estimulados por um maior período, fazendo com que atingisse o tamanho pré-ovulatório de forma mais precoce. Esse efeito também é observado em bovinos, em que há um aumento na taxa de crescimento folicular quando da utilização de eCG em relação ao FSH (Sales et al., 2011). Portanto, no presente estudo, a diferença no momento da ocorrência da ovulação para os tratamentos utilizados sugere um ajuste no tempo utilizado na inseminação artificial em tempo fixo. Porém, considerando-se um intervalo de ocorrência das ovulações de 24 horas, ou seja, um intervalo relativamente curto para garantir a viabilidade tanto do espermatozoide, quanto do oócito, somente 70% dos animais que receberam o tratamento com eCG ovularam entre 64,5 h à 84,7 h ($73,7 \pm 6,5$), enquanto que com o FSH:LH, somente 61% das ovelhas ovularam entre 72,6 h e 96,8 h ($82,6 \pm 8,1$). Portanto, em $\approx 35\%$ (16/45) dos animais, a ocorrência da ovulação se dá precocemente ou tardiamente, o que afeta significativamente a sincronia da ovulação com esses protocolos.

Em programas de inseminação artificial em tempo pré-determinado é indispensável que os protocolos hormonais utilizados sincronizem eficientemente a ovulação (Moreira et al., 2014), principalmente quando o sêmen congelado, que é utilizado possui menor viabilidade (Bailey et al., 2003). Entretanto, poucos estudos avaliam a dispersão do estro e ovulação, limitando-se apenas em demonstrar a média do início do estro e do momento da ocorrência da ovulação (Neto et al., 2012; Balara et al., 2015; Oliveira et al., 2016). Neste estudo, embora a média do início da manifestação do estro tenha ocorrido de forma diferente entre os tratamentos eCG e FSH:LH, a sincronia da manifestação estral ocorreu de forma semelhante entre os dois hormônios nas duas épocas estudadas, mostrando que a eficiência dos promotores de crescimento folicular em sincronizar o estro é similar. No entanto, houve uma influência da época sobre a sincronia do estro quando se utilizou o FSH:LH, mostrando que estas gonadotrofinas foram mais eficazes na época seca em sincronizar o estro do que na época chuvosa. O mesmo efeito tendeu a ocorrer para o eCG ($P = 0,10$). Entretanto, essa modificação na sincronia do estro não foi suficiente para alterar a sincronia da ovulação de forma semelhante. Além disso, também foi observado que o tratamento com FSH:LH foi semelhante ao com eCG, nas duas épocas, em sincronizar a ovulação, e portanto uma gonadotrofina pode ser substituído pela outra em programas de inseminação artificial, desde que seja observado e ajustado o momento da inseminação de acordo com a média do estro e ovulação para cada hormônio. Entretanto, vale-se ressaltar que a dispersão da ovulação ainda é alta e a necessidade de novas abordagens que reduzam essa dispersão ainda é uma realidade.

O diâmetro do maior folículo neste estudo não sofreu influência nem do hormônio e nem da época, mostrando que tanto o eCG quanto o FSH:LH promoveram o

desenvolvimento final folicular de forma semelhante. Entretanto, o número de ovulações sofreu uma interação entre o hormônio e a época do ano, sendo similar entre as épocas, no hormônio eCG, enquanto que, no hormônio FSH:LH sofreu uma redução no período seco. Contrariamente, o uso dos dois promotores de desenvolvimento folicular não diferiu no número de ovulações na época seca em ovelhas da raça Santa Inês (Moreira et al., 2014) mostrando que além do efeito da época do ano, pode existir uma influência anual. A divergência nos resultados de número de ovulações, no mesmo período do ano, deve ser melhor investigada, uma vez que, isso poderia influenciar no tipo de parto e conseqüentemente no peso ao nascer e na mortalidade perinatal dos cordeiros (Christley et al., 2003; Holmoy et al., 2012).

A julgar pelo volume do corpo lúteo, a utilização de eCG promoveu um maior efeito luteotrófico do que o FSH:LH (Figura 3b). Sabe-se que o suporte de LH é obrigatório para o crescimento inicial do CL e para a diferenciação celular após a ovulação (Bartlewski et al., 2011). O eCG possui ação de FSH e LH e devido ao seu longo tempo de meia-vida, apresenta um período prolongado de ação (revisado por [Murphy, 2012]). Possivelmente, após a ovulação, ainda havia concentrações plasmáticas de eCG que resultaram em um maior crescimento do corpo lúteo. García-Pintos e Menchaca (2016) observaram um aumento no tamanho do corpo lúteo e concentração de progesterona após aplicação com eCG. Paradoxalmente, o uso de FSH:LH resultou em um menor volume total dos CL e uma maior concentração de progesterona. O corpo lúteo é composto de células luteais grandes e pequenas, células endoteliais, fibroblastos, pericitos e células provenientes da corrente sanguínea e as concentrações séricas de progesterona são dependentes da quantidade de tecido esteroideogênico, do fluxo sanguíneo e da capacidade do tecido esteroideogênico em sintetizar progesterona (revisado por [Niswender et al., 2000]). É possível que a aplicação de eCG tenha alterado a proporção das células presentes no corpo lúteo durante a sua formação, resultando em um aumento no volume total dos corpos lúteos sem aumento na produção de progesterona. Neste estudo, apesar da diferença, o uso dos promotores de crescimento folicular, nas duas épocas estudadas, resultou em corpos lúteos funcionais com produção de progesterona acima de 1 ng/mL.

No geral, os protocolos utilizados foram eficientes em induzir o estro, a ovulação e a formação de um corpo lúteo funcional, entretanto, não sincronizaram, de forma eficiente, o estro e a ovulação em ovelhas da raça Santa Inês, nas duas épocas estudadas. A falta de sincronia da ovulação no protocolo longo utilizando MAP e eCG ou FSH:LH pode influenciar negativamente nas taxas de gestação após IATF. Entretanto, vale-se ressaltar que a média geral do tempo entre o estro à ovulação ($30,17 \pm 6,4$ horas) não sofre grandes modificações,

independente da condição folicular ao início do protocolo (Oliveira et al., 2016), época do ano estudada (Balaro et al., 2015; Oliveira et al., 2016) ou qualidade da pastagem (Balaro et al., 2015). Portanto, para se utilizar os protocolos adotados neste experimento com eficiência, seria necessário a observação do estro para prever com precisão o momento da ocorrência da ovulação, não sendo indicado a utilização de inseminação artificial em tempo fixo com sêmen congelado.

7 CONCLUSÃO

Em ovelhas deslanadas, em 15° de latitude sul durante as épocas chuvosa e seca, o tratamento de 20 UI de FSH:LH no final de 12 dias de tratamento com MAP atrasa o início da manifestação do estro e a ocorrência da ovulação em relação ao tratamento com 300UI de eCG, sendo necessária a adoção de diferentes momentos para a inseminação artificial, para cada um dos protocolos.

A época seca melhora a sincronia do início da manifestação do estro do que na época chuvosa. Entretanto, ambos os protocolos nas duas épocas apresentam uma grande dispersão do momento do início da manifestação do estro e do momento da ocorrência da ovulação resultando em baixa sincronia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 173-179, Feb 2012.
- ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.
- AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 152-161, Feb 2012.
- ARROYO, L. J. et al. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19 degrees north latitude. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 1-2, p. 24-30, Nov 2007.
- BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 393-401, Sep 2003.
- BALARO, M. F. A. et al. Reproductive performance, metabolic and hormonal profiles of Santa Ins ewes in winter and summer under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 3, p. 627-631, Mar 2015.
- BALARO, M. F. A. et al. Is the Santa Ins sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 8, p. 1533-1537, Dec 2014.
- BARRETT, D. M. W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 311-327, Jan 2004.
- BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 259-268, Apr 2011.

- BODIN, L. et al. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 37, n. 6, p. 651-660, Nov-Dec 1997.
- BOSCOS, C. M. et al. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1261-1272, Oct 2002.
- CHRISTLEY, R. M. et al. Factors related to the risk of neonatal mortality, birth-weight and serum immunoglobulin concentration in lambs in the UK. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 4, p. 209-226, Apr 2003.
- FRY, R. C. et al. The half-life of follicle-stimulating-hormone in ovary-intact and ovariectomized booroola and control merino ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 611-615, Nov 1987.
- GARCIA-PINTOS, C.; MENCHACA, A. Luteal response and follicular dynamics induced with equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after insemination in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 202-207, Mar 2016.
- HASHEM, N. M. et al. Effect of season, month of parturition and lactation on estrus behavior and ovarian activity in Barki x Rahmani crossbred ewes under subtropical conditions. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1327-1335, Apr 2011.
- HOLMOY, I. H. et al. Housing conditions and management practices associated with neonatal lamb mortality in sheep flocks in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 107, n. 3-4, p. 231-241, Dec 2012.
- MACIAS-CRUZ, U. et al. Reproductive efficiency of Pelibuey and Romanov x Pelibuey ewes synchronized with synthetic progesterone and low doses of PMSG under a hot environment. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, n. 12, p. 546-553, 2013.
- MARTINUK, S. D. et al. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological-activity of equine chorionic-gonadotropin in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 598-604, Oct 1991.
- MOREIRA, N. H. et al. Utilização de FSH:LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.
- MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, Jul-Sep 2012.
- NETO, B. M. C. et al. Follicle-stimulating hormone to substitute equine chorionic gonadotropin in the synchronization of ovulation in Santa Ines ewes. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 603-606, Mar 2012.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, Jan 2000.
- OLIVEIRA, M. E. F. et al. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in

Santa Ines ewes under subtropical conditions. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 452-460, Feb 2016.

RODRIGUES, P. D. et al. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under subtropical conditions. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 5, p. 468-475, Sep-Oct 2007.

SALES, J. N. S. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1-2, p. 12-18, Mar 2011.

SASA, A. et al. Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Borregas Lanadas e Deslanadas no Período de Abril a Novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1150-1156, 2002.

SILVA, A. E. D. F. et al. Efeito do manejo nutricional sobre a taxa de ovulação e de folículos, no decorrer do ano, em ovinos deslanados no nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 635-645, 1987.

SOUZA, M. I. L. Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 220-225, 2013.

THOMPSON, J.; MEYER, H. **Body condition scoring of sheep**. UNIVERSITY, O. S. Corvallis: OSU Extension Catalog 1994.

CAPÍTULO 3

SINCRONIA DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS SOB CONDIÇÕES TROPICAIS, EM DIFERENTES ÉPOCAS, UTILIZANDO PROTOCOLO LONGO COM eCG

1 RESUMO

O protocolo longo de sincronização do estro ovino proporciona variáveis taxas de fertilidade, ocasionado por muitos fatores intrínsecos e extrínsecos. A influência da estação do ano (chuvosa, seca e transições) foi avaliada, durante dois anos consecutivos, quanto ao desenvolvimento folicular e sincronia do estro e da ovulação em ovelhas deslanadas (n = 12), sincronizadas com MAP por 12 dias e mantidas em 15° de latitude sul, sob condições tropicais. Em todas as épocas, uma alta porcentagem de animais manifestou estro, ovulou e teve a formação de pelo menos um corpo lúteo funcional após o tratamento hormonal. Na estação seca houve maior concentração do momento do início da manifestação do estro do que na estação chuvosa, e as estações seca e transição seca/chuva concentraram mais a ocorrência da ovulação do que a estação chuvosa. Entretanto, todas as épocas não sincronizaram de forma eficiente o estro e a ovulação o que poderia afetar negativamente as taxas de fertilidade.

Palavras chave: MAP, ovino, estações do ano, sazonalidade reprodutiva

2 ABSTRACT

The long protocol sheep estrus synchronization provides variable fertility rates, caused by many intrinsic and extrinsic factors. The influence of the season (rainy, dry and transitions) was evaluated for two consecutive years, as the follicular development and synchronization of estrus and ovulation in hair sheep (n = 12), synchronized with MAP for 12 days and kept in 15 ° south latitude, under tropical conditions. In all seasons, a high percentage of animals showed estrus, ovulated and had the formation of at least a functional corpus luteum after hormone treatment. In the dry season there was a higher concentration at the time of onset of estrus than in the rainy season, and dry season and dry/rainy transitions showed a higher concentration of ovulation than the rainy season. However, all periods not synchronized, efficiently, estrus and ovulation which could negatively affect fertility rates.

Keywords: MAP, sheep, seasons of the year, reproductive seasonality

3 INTRODUÇÃO

A reprodução sazonal é uma característica marcante dos ovinos. O período em que ocorre e o tempo de duração das estações reprodutiva e não reprodutiva são afetados por um conjunto de fatores que estão interligados, como o fotoperíodo, as condições climáticas, a raça e interações sociais entre macho e fêmea (Rosa & Bryant, 2003; Delgadillo et al. 2009; Gómez-Brunet et al., 2012). Devido à essa característica dos ovinos, muitos protocolos hormonais foram criados ao longo dos anos visando um aumento na eficiência reprodutiva dos rebanhos. Entretanto, até o presente momento, o protocolo mais utilizado na sincronização do estro ovino, baseia-se no tratamento longo com progestágeno (MAP, FGA)/progesterona (P4) associados à gonadotrofina coriônica equina (eCG) (revisado por [Wildeus, 2000; Abecia et al., 2011; Amiridis & Cseh, 2012; Souza, 2013]).

O comportamento da resposta a esses protocolos pode ser ditado pela forma como a época do ano influencia a reprodução em cada raça (Barrett et al., 2004; Oliveira et al., 2016). Em climas temperados, os períodos de anestro parecem estar bem delimitados, devido as mudanças marcantes no fotoperíodo (Rosa & Bryant, 2003; Gómez-Brunet et al., 2012). Entretanto, as regiões de clima tropical são caracterizadas por mudanças mínimas no comprimento de duração do dia e por grandes alterações nas condições climáticas (Rosa & Bryant, 2003; Gómez-Brunet et al., 2012; Lv et al., 2014). Não se sabe até o momento quanto essa mudança no fotoperíodo e nas condições climáticas poderia afetar o comportamento reprodutivo após a utilização de protocolos hormonais em 15° latitude sul.

Em áreas subtropicais a tropicais em 23°N-23°S, uma porcentagem variável de ovelhas nativas ou adaptadas podem exibir diferentes períodos de aciclicidade, ao longo do ano, de forma imprevisível, e em alguns casos, intermitente (Cerna et al., 2000; Arroyo et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Gómez-Brunet et al., 2012; Moraes et al., 2013; Balaro et al., 2014; Arroyo et al., 2016). O que poderia levar a uma alteração nos parâmetros reprodutivos pós

tratamento hormonal. Não se sabe precisamente porque isso ocorre, no entanto, isso aparenta ter uma relação entre genética e ambiente. A eficiência do protocolo de sincronização do estro tem sido questionada por muitos autores, devido à utilização destes protocolos em programas de inseminação artificial resultar em variáveis taxas de fertilidade (Wildeus, 2000; Anel et al., 2005; Barrett et al., 2008; Martinez et al., 2015). Assim, a busca por novas metodologias ou por fatores que limitam a utilização dessa técnica ainda tem sido uma realidade constante. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito das épocas chuvosa, seca e transições, sobre a dinâmica folicular, sincronia do estro e da ovulação em ovelhas deslanadas sincronizadas com protocolo longo, em dois anos consecutivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Protocolo CEUA- UnBDOC n°. 116278/2011)

4.1 Animais e delineamento experimental

O experimento foi realizado nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro, nos anos de 2012 e 2013, em Brasília, Distrito Federal, localizado a 15°47' de latitude sul e 47°55' de longitude oeste, 1080m de altitude, de clima tropical. O clima da região é caracterizado por verão chuvoso e inverno seco, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013), com a precipitação, temperatura, umidade representadas no Quadro 1.

Quadro 1. Informações meteorológicas dos meses fevereiro, maio, agosto e novembro, nos anos 2012 e 2013, fornecidas pela estação climatológica automática da Fazenda Água Limpa (FAL), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (FAV/UnB), em Brasília-DF, Brasil

Ano	Mês	Prec. mm	T méd. °C	T máx. °C	T mín. °C	UR méd. %	UR máx. %	UR mín. %
2012	Fev	196,4	20,8	27,8	15,2	80,0	98,2	49,3
	Mai	59,4	18,4	25,6	12,5	81,2	98,1	51,5
	Ago	0,0	18,6	26,9	10,2	56,4	86,1	30,0
	Nov	374,4	21,4	27,4	17,5	84,5	98,6	55,6
2013	Fev	128,2	21,8	29,3	15,7	76,8	98,1	44,8
	Mai	36,2	18,9	27,6	11,3	75,8	98,5	41,8
	Ago	0,0	19,0	28,6	9,4	57,5	89,5	27,9
	Nov	207,2	21,2	27,9	16,2	80,4	97,8	50,9

Prec. – precipitação total; T med. – temperatura média; T máx. – temperatura máxima; T mín. – temperatura mínima; UR med. – umidade relativa média; UR máx. – umidade relativa máxima; UR min. – umidade relativa mínima.

Foram utilizadas 96 ovelhas deslanadas da raça Santa Inês, híginas, com idade entre 2 e 5 anos, peso médio de $48,2 \pm 6,9$ kg, escore de condição corporal entre 3,0 (escala de 1 a 5 [Thompson e Meyer, 1994]). Os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* e no período das avaliações do estro e ovulação, todos os animais foram alocados em baias coletivas recebendo feno de Tifton (*Cynodon sp.*). Em todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e sal mineral. No inverno (período seco) os animais foram suplementados com silagem de milho para manutenção da condição corporal.

Em cada mês, as ovelhas ($n = 12$) tiveram o estro sincronizado através da inserção de pessários vaginais impregnados com 60 mg de MAP (Progespon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A), que permaneceram por 12 dias. No momento da retirada do pessário vaginal, as ovelhas receberam 300 UI de eCG (Novormon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A.) por via intramuscular. Os períodos estudados corresponderam à estação chuvosa (fevereiro), transição chuvosa-seca (maio), seca (agosto) e transição seca-chuvosa (novembro), formando assim quatro Grupos: Chuva; Chuva/Seca; Seca; Seca/Chuva. Além disso, o experimento foi desenvolvido em dois anos consecutivos para minimizar o efeito de um ano atípico sobre a resposta ao protocolo hormonal.

4.2 Avaliação do estro

Ao final do protocolo as ovelhas foram mantidas na presença de um rufião, que teve a região do externo pintado com uma mistura de óleo e tinta em pó. O estro foi avaliado em intervalos de quatro horas, por um período de 30 min, sendo consideradas em estro as fêmeas que aceitavam a monta e que estavam marcadas na região da garupa. Foram registrados os seguintes parâmetros: incidência de estro (%), obtido pela razão do número de ovelhas em estro pelo número total de ovelhas do tratamento; momento do início da manifestação do estro sendo o tempo entre a remoção do pessário até o início da manifestação estral; e dispersão do momento do início da manifestação do estro sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado do início da manifestação do estro em cada tratamento.

4.3 Avaliação ultrassonográfica

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas, em cada ovelha, doze horas após o início da manifestação estral. Os exames ultrassonográficos foram realizados em intervalos de 8 horas usando scanner modo-B em tempo real, Mindray DP-2200Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical, Electronics CO, LTD, China), com transdutor linear multifrequencial adaptado para exame transretal. Todas as imagens foram obtidas na frequência de 7,5MHz.

Os seguintes parâmetros foram registrados: momento para a ocorrência da ovulação sendo o tempo entre a remoção do pessário vaginal até a ovulação; intervalo estro/ovulação sendo a diferença entre o momento da ocorrência da ovulação e o momento do início da manifestação do estro; dispersão do momento da ocorrência da ovulação sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado para o momento da ocorrência da ovulação em cada estação; diâmetro do maior folículo obtido pela média das duas maiores diagonais do folículo ovulatório, no momento da avaliação precedente à constatação da ovulação.

O momento da ocorrência da ovulação foi determinado como a média do tempo entre a última avaliação que o folículo ovulatório ($\geq 4\text{mm}$) estava presente e a avaliação em que se verificou o seu desaparecimento. Quando mais de um folículo ovulou em avaliações distintas foi considerado o momento da ovulação do primeiro folículo ovulado. Somente foram consideradas responsivas ao tratamento as ovelhas que manifestaram estro e ovularam no período de 118 horas após a retirada do pessário vaginal.

Sete dias após a ovulação foi realizado um novo exame ultrassonográfico para mensuração do diâmetro luteal (média das duas maiores diagonais do CL). Os seguintes parâmetros foram registrados: número de corpos lúteos; volume total dos corpos lúteos, obtido pela fórmula matemática do volume do cilindro e o volume total obtido pela soma do volume de todos os corpos lúteos presentes nos dois ovários.

4.4 Dosagem hormonal

No dia da avaliação do CL, antes das avaliações ultrassonográficas, foram realizadas coletas de sangue para a mensuração da concentração sérica de progesterona. O sangue foi coletado por venopunção jugular, em tubos à vácuo sem anticoagulante, sendo posteriormente centrifugados. Logo após, o soro foi aspirado e estocado em microtubos de 2,0 mL e armazenado a -20°C até a análise. As concentrações séricas de progesterona (P4) foram mensuradas por radioimunoensaio (RIA), utilizando kits comerciais (Coat-a-Count, DPC, Diagnostic Products Co, Los Angeles, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio foi de 4,6%.

4.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team, 2014). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (D.P.) ou porcentagem, sendo considerados significativos quando $P \leq 0,05$ e como tendência quando $0,06 \leq P \leq 0,10$. Devido à instabilidade das variáveis estudadas, todas as variáveis foram submetidas a análises visuais para avaliar a homocedasticidade (boxplot) e a normalidade (hist, plot-density, qqnorm e qqline), sendo comprovadas pelo teste de Bartlett (bartlett.test) e de Shapiro-Wilk (shapiro.test), respectivamente.

Devido ao comportamento da maioria dos dados não se adequar ao de uma distribuição normal, aderiu-se a utilização de modelos lineares generalizados (glm). A adequabilidade da distribuição utilizada em cada variável foi analisada através dos gráficos de envelopes simulados para os resíduos, utilizando-se a função de ligação em que os dados melhor

se adequaram. Após o ajuste do modelo, foi utilizada uma análise de desvio (anova) para interpretação quanto à significância dos resultados.

Somente as variáveis “momento do início da manifestação do estro”, “intervalo estro/ovulação” e “volume do maior corpo lúteo” apresentaram interação entre a época e o ano, e as diferenças foram analisadas por um teste de contraste t-test (contrast). As variáveis que não apresentaram interação, e que apresentaram algum tipo de influência, da época ou do ano, foram agrupadas para comparação. As variáveis que não apresentaram interação entre a época e o ano, e que apresentaram uma influência separadamente da época ou do ano, foram agrupadas em cada categoria para análise. A incidência de estro foi avaliada pelo teste exato de Fisher (fisher.test). A dispersão do momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação foi analisada com o teste F na razão de variâncias (var.test) combinado com análise gráfica das distribuições de densidades (density).

5 RESULTADOS

Os animais iniciaram a manifestação dos sinais clínicos de estro entre 26 h e 82 h e ovularam entre 50 h e 107 h após a remoção do progestágeno. Foram consideradas responsivas aos tratamentos e utilizadas para análise estatística, as ovelhas que manifestaram estro e ovularam dentro de 118 horas após a retirada do MAP. A taxa global de incidência de estro foi de 92,7% ($P > 0,05$). Houve interação entre a época e o ano ($P = 0,046$) no momento do início da manifestação do estro e no intervalo estro/ovulação. O momento do início da manifestação do estro na época chuvosa ocorreu mais cedo no ano de 2012 ($41,8 \pm 15,3$ horas) do que o ano de 2013 ($52,6 \pm 12,3$ horas; $P = 0,02$), além disso, a época de transição chuva/seca ($51,6 \pm 9,1$ horas) atrasou mais o momento do início da manifestação do estro em relação à época chuvosa ($41,8 \pm 15,3$ horas; $P = 0,04$) no ano de 2012. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as épocas quanto ao momento da ocorrência da ovulação, sendo a média global de $76,2 \pm 12,2$ horas. O intervalo estro/ovulação foi mais curto na transição chuva/seca ($25,7 \pm 3,8$ horas) do que na época chuvosa ($30,9 \pm 8,0$ horas; $P = 0,03$) no ano de 2012 e mais curto na época seca ($26,6 \pm 5,1$ horas) do que na transição seca/chuva ($31,6 \pm 4,3$ horas; $P = 0,04$) no ano de 2013 (Figura 1).

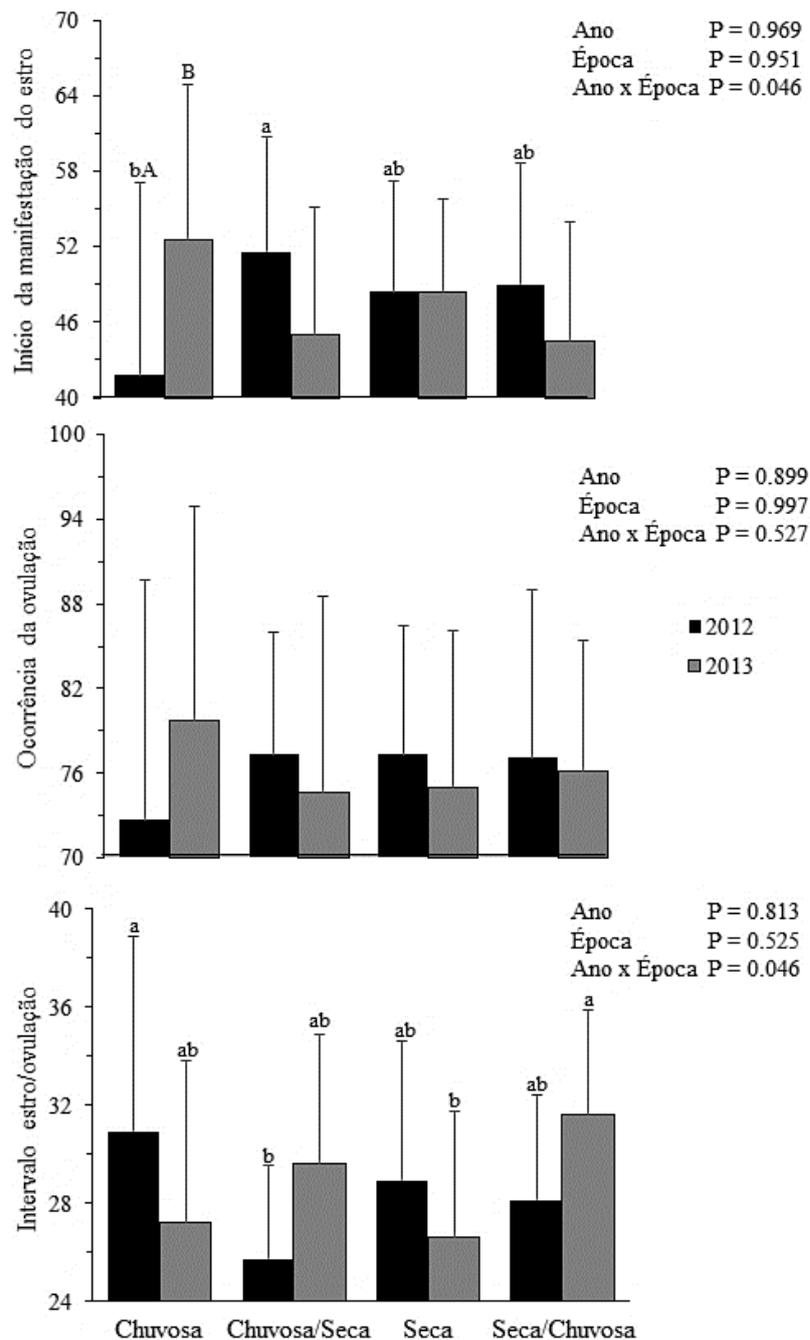


Figura 1. Média \pm D.P. do momento do início da manifestação do estro, momento da ocorrência da ovulação e intervalo estro/ovulação durante as épocas chuvosa (fevereiro), transição chuvosa/seca (maio), seca (agosto) e transição seca/chuvosa (novembro), nos anos de 2012 e 2013, após tratamento com protocolo longo de sincronização do estro em ovelhas deslanadas. ^{ab}Letras minúsculas indicam diferenças entre os meses em cada ano. ^{AB}Letras maiúsculas indicam diferença entre os anos no mesmo mês.

Não houve diferença na dispersão dos momentos do início da manifestação do estro (Figura 2a, b, c, d) e da ocorrência da ovulação (Figura 3a, b, c, d) em cada época entre os dois anos estudados, portanto os dados foram agrupados para comparação entre épocas. O momento do início da manifestação do estro variou em 56 h, 34h, 29h e 36h nas épocas chuvosa, chuva/seca, seca e seca/chuva, respectivamente. A época chuvosa concentrou menos o estro do que a época seca ($P = 0,006$) e teve uma tendência a concentrar menos do que as épocas de transição chuvosa/seca ($P = 0,09$) e seca/chuvosa ($P = 0,06$; Figura 2e).

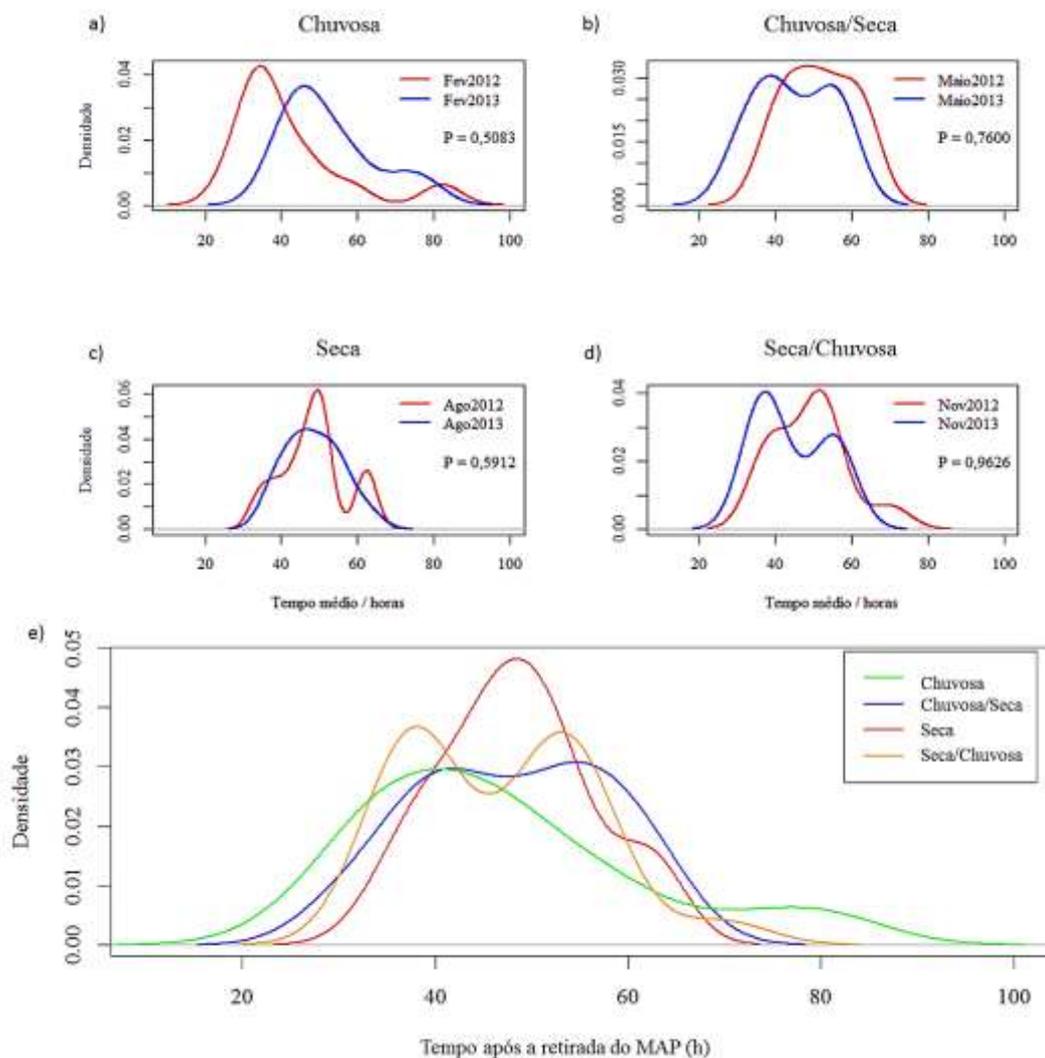


Figura 2. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslançadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG em diferentes épocas do ano. Comparação entre anos em cada época (a, b, c, d) e comparação entre épocas com os dados agrupados (e).

O momento da ocorrência da ovulação variou em 56 h, 40h, 41h e 40h nas épocas chuvosa, chuvosa/seca, seca e seca/chuvosa, respectivamente. A época chuvosa concentrou menos a ovulação do que a época seca ($P = 0,031$) e transição seca/chuvosa ($P = 0,047$; Figura 3e).

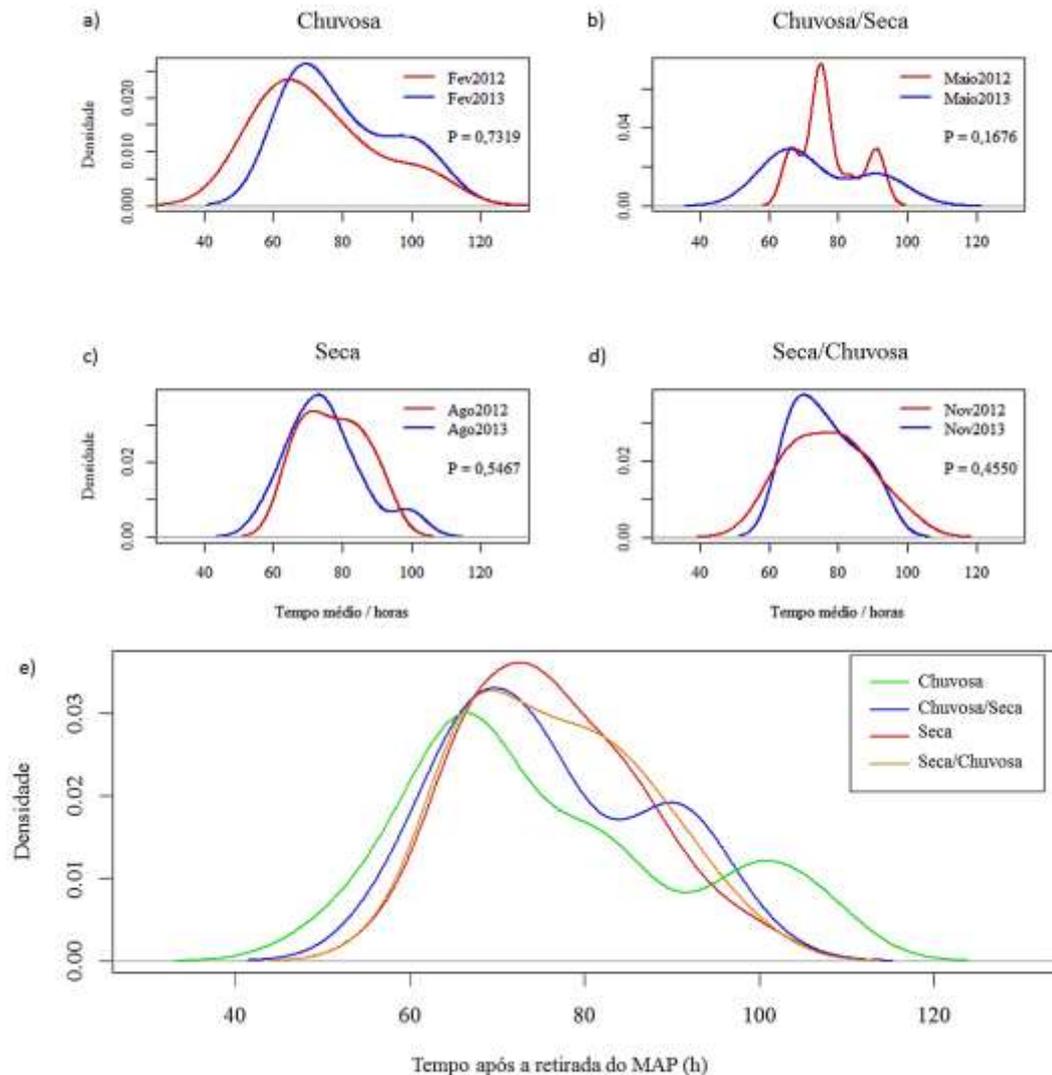


Figura 3. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando MAP em combinação com eCG em diferentes épocas do ano. Comparação entre anos em cada época (a, b, c, d) e comparação entre épocas com os dados agrupados (e).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as épocas para o diâmetro do maior folículo, número de corpos lúteos e concentração de progesterona, apresentando média global

de $6,1 \pm 0,7$ mm, $1,7 \pm 0,8$ e $3,2 \pm 1,6$ ng/mL, respectivamente. O volume total dos corpos lúteos foi maior na época seca em relação à época chuvosa ($P = 0,032$) e transição seca/chuva ($P = 0,028$; Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm D.P. dos parâmetros foliculares, luteais e hormonais de ovelhas deslanadas, criadas em condições tropicais, submetidas a protocolo longo de sincronização, em diferentes épocas do ano

Variável	Época do ano			
	CHUVOSA Fevereiro	CHUVOSA/SECA Maio	SECA Agosto	SECA/CHUVOSA Novembro
Diâmetro do > folículo (mm)	$6,3 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,6$	$6,1 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,7$
Número de corpos lúteos	$1,6 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,5$	$1,8 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,9$
Volume total dos CL (mm ³)	$732,2 \pm 410,4b$	$850,5 \pm 340,4ab$	$1040,9 \pm 506,8a$	$724,3 \pm 324,1b$
Concentração de P4 (ng/mL)	$2,6 \pm 0,9$	$4,0 \pm 2,0$	$3,1 \pm 1,5$	$3,2 \pm 1,8$

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P = 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Os ovinos da raça Santa Inês em 21° de latitude e clima tropical, apresentam maior ciclicidade quando o comprimento do dia é decrescente (março a junho) ou crescente (julho a novembro) do que nos períodos em que o dia é estavelmente longo (dezembro à fevereiro) (Oliveira et al., 2016). Nesse estudo, essa mudança na ciclicidade não afetou a alta porcentagem de animais que exibem estro após a indução com protocolo hormonal longo com P4. Durante os dois anos do presente estudo realizado a 15° de latitude sul, foi observada em todas as épocas do ano uma alta porcentagem de animais em estro ao final do protocolo (92,7%), resultado semelhante ao obtido por nossa equipe em estudo similar (Moreira et al., 2014). Entretanto, apenas a taxa de manifestação de estro não é um bom parâmetro para prever a eficácia dos protocolos de sincronização com relação aos índices de fertilidade após inseminação artificial em tempo fixo.

Hipotetiza-se que a falha na sincronia do estro e das ovulações possam estar interligadas com a maioria dos fatores apontados por alterar a fertilidade (Revisado por [Wildeus, 2000]). A época do ano exerceu uma influência sobre a fertilidade em 22.758 ovelhas sincronizadas com protocolo longo com FGA (Anel et al., 2005). Nesse estudo, apesar dos baixos índices obtidos, a época reprodutiva melhorou a fertilidade em relação à estação não reprodutiva. No presente trabalho, a época seca (inverno) sincronizou melhor o estro, e as épocas seca (inverno) e seca/chuva (primavera) sincronizaram melhor a ovulação do que a época chuvosa (verão). Até a presente data, não foram encontrados estudos que avaliem a ciclicidade de ovelhas deslanadas da raça Santa Inês em 15° de latitude sul, entretanto, em 21° de latitude sul as épocas seca e seca/chuva correspondem à estação reprodutiva e a época chuvosa à estação não reprodutiva (Oliveira et al., 2016). Esses resultados sugerem que uma melhora na sincronia da ovulação na estação reprodutiva pode levar a um aumento nos índices

de fertilidade. Entretanto, o protocolo longo com MAP, não concentrou o estro e a ovulação satisfatoriamente durante os dois anos estudados, o que leva a supor que, isso poderia ser o responsável pela alta variação nos resultados de fertilidade encontrados (Hill et al., 1998; Simonetti et al., 2000; Anel et al., 2005; Santos-Neto et al., 2015). Esse resultado confirma a falta de sincronia do estro e ovulação por nossa equipe em outro estudo utilizando o mesmo protocolo (Moreira et al., 2014), bem como reforça a observação de uma ampla variação no estro por outros autores (60 horas [Simonetti et al., 2000]; 96 horas [Vinoles et al., 2001]).

A época do ano afetou a média do momento do início da manifestação do estro e intervalo estro/ovulação, porém não afetou a média do momento da ocorrência da ovulação. Foi interessante notar que existiu um mecanismo compensatório entre o momento do início da manifestação do estro e o intervalo entre o estro e a ovulação (Figura 2), onde o momento do início da manifestação do estro ocorreu mais cedo resultou no aumento do intervalo estro/ovulação, ocorrendo de forma contrária quando o estro iniciou mais tarde. Esse mecanismo provavelmente foi o responsável pela época do ano não ter influenciado na média do tempo para a ovulação. Assim, em geral, pôde-se observar que os fatores relacionados à época do ano mostraram ter uma influência importante na resposta ao protocolo hormonal empregado. Uma vez que esses fatores mudam muito entre regiões geográficas distintas, a realização de trabalhos que adequem os protocolos a realidade local é essencial. A busca por protocolos que sincronizem a ovulação em um período de tempo curto e a comprovação da importância dessa sincronia na inseminação artificial em tempo fixo é extremamente importante. No entanto, até que isso se concretize, após a sincronização utilizando protocolo longo com MAP, segue-se a inseminação artificial com observação do estro de forma individual, levando em consideração o tempo entre o início da manifestação do estro à ovulação (média global de $28,7 \pm 5,7$ horas), porque este não sofre grandes alterações entre diferentes estudos (Letelier et al., 2011; Balara et al., 2015; Oliveira et al., 2016).

A época do ano não afetou o diâmetro do maior folículo, o número de corpos lúteos e a concentração de progesterona, entretanto, foi observado um aumento no volume total dos corpos lúteos na época seca em relação às épocas de transição seca/chuvosa e chuvosa. O motivo porque isso ocorreu é difícil de explicar, uma vez que o mesmo padrão não foi observado nos parâmetros foliculares e na concentração de progesterona. Aparentemente, os períodos de ciclicidade, anestro e transições podem alterar o padrão de secreção de LH em animais que exibem estacionalidade reprodutiva (Rosa & Bryant, 2003) e esse hormônio é essencial para a formação do corpo lúteo (Niswender et al., 2000). Portanto, é possível que as pequenas mudanças no fotoperíodo e/ou as mudanças climáticas nos períodos estudados possam estar

envolvidos em pequenas alterações no padrão de secreção de LH, o que pode ter modificado a quantidade e/ou volume das células luteinizadas, sem afetar a produção de progesterona.

No geral, embora uma alta porcentagem de ovelhas deslanadas da raça Santa Inês apresentem ciclicidade ao longo do ano em latitudes mais baixas (Balara et al., 2014), a resposta ao protocolo de sincronização sofreu alterações nas diferentes épocas do ano, mas não afetou a eficiência do protocolo na taxa de manifestação do estro e momento da ocorrência da ovulação e na formação de um corpo lúteo funcional. Essas modificações, uma vez que alteraram o momento do início da manifestação do estro e a sincronia do estro e da ovulação, devem ser consideradas para definir qual a melhor metodologia a ser empregada na inseminação artificial (p.ex. método e horário de IA e tipo de sêmen), em cada época. Entretanto, é importante ressaltar que a falta de sincronia da ovulação observada no protocolo utilizando MAP e eCG pode influenciar negativamente as taxas de gestação após IATF. Como a média geral o intervalo entre o estro à ovulação ($28,7 \pm 5,7$ h) não sofre grandes modificações entre diferentes estudos (Balara et al., 2015; Oliveira et al., 2016), sugere-se que após a utilização do protocolo longo com MAP em condições de campo, seja realizada a observação de estro para pré-determinar, individualmente, o momento mais apropriado para a inseminação artificial, e assim garantir melhores taxas de fertilidade.

7 CONCLUSÃO

O protocolo longo com MAP e 300 UI de eCG sincroniza melhor o estro na época seca do que na chuvosa e a ovulação ocorre de forma mais sincronizada na época seca e transição seca/chuvosa em relação à época chuvosa. Entretanto, esse tratamento hormonal, nas quatro épocas estudadas, apresenta um grande intervalo entre a primeira e a última ovelha a manifestarem o estro e também ovularem, resultando em baixa sincronia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 67-79, Mar 2011.

ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.

AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 152-161, Feb 2012.

ANEL, L. et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235-1247, Mar 2005.

ARROYO, J. et al. Reproductive seasonality in creole hair sheep in the tropic. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 1, p. 219-222, Jan 2016.

ARROYO, L. J. et al. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19 degrees north latitude. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 1-2, p. 24-30, Nov 2007.

BALARO, M. F. A. et al. Reproductive performance, metabolic and hormonal profiles of Santa Ins ewes in winter and summer under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 3, p. 627-631, Mar 2015.

BALARO, M. F. A. et al. Is the Santa Ins sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 8, p. 1533-1537, Dec 2014.

BARRETT, D. M. W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 311-327, Jan 2004.

BARRETT, D. M. W. et al. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, Apr 2008.

CERNA, C. et al. Effect of an inverse subtropical (19° 13' N) photoperiod on ovarian activity, melatonin and prolactin secretion in Pelibuey ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 511-525, Jul 2000.

DELGADILLO, J. A. et al. The 'male effect' in sheep and goats—Revisiting the dogmas. **Behavioural Brain Research**, v. 200, n. 2, p.304-314, Jun 2009.

GÓMEZ-BRUNET, A. et al. Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, n. 1, p. S47-S70, 2012.

HILL, J. R.; THOMPSON, J. A.; PERKINS, N. R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: A survey. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 697-709, Mar 1998.

LETELIER, C. A. et al. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 1-2, p. 61-69, Jun 2011.

LV, F. H. et al. Adaptations to Climate-Mediated Selective Pressures in Sheep. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 12, p. 3324-3343, Dec 2014.

MARTINEZ, M. F. et al. Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH plus progesterone oestrus synchronisation protocol. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 28-35, Apr 2015.

MORAES, G. V. et al. Frequency of estrus in Santa Ines, Texel and Ile de France ewes in the northwest of Parana State, Brazil. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 42, n. 10, p. 706-712, Oct 2013.

MOREIRA, N. H. et al. Utilização de FSH:LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, Jan 2000.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in Santa Ines ewes under subtropical conditions. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 452-460, Feb 2016.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014. Disponível em: < <http://www.R-project.org/> >. Acesso em: 02 de Fevereiro.

RODRIGUES, P. D. et al. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under subtropical conditions. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 5, p. 468-475, Sep-Oct 2007.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 3, p. 155-171, Jun 2003.

SANTOS-NETO, P. C. et al. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. **Livestock Science**, v. 182, p. 125-128, Dec 2015.

SIMONETTI, L.; BLANCO, M. R.; GARDON, J. C. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. **Small Ruminant Research**, v. 38, n. 3, p. 243-247, Nov 2000.

SOUZA, M. I. L. Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 220-225, 2013.

THOMPSON, J.; MEYER, H. **Body condition scoring of sheep**. UNIVERSITY, O. S. Corvallis: OSU Extension Catalog 1994.

VINOLES, C. et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 993-1004, Mar 2001.

WILDEUS, S. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and Goats. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1-14, 2000.

CAPÍTULO 4

**EFEITO DO ESTRADIOL E SEUS ÉSTERES SOBRE A LIBERAÇÃO DE
GONADOTROFINA E DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS DESLANADAS
TROPICALMENTE ADAPTADAS SINCRONIZADAS COM PROGESTERONA**

1 RESUMO

O perfil de estradiol e FSH foram avaliados em ovelhas ovariectomizadas tratadas com 2 mg de E-17 β , BE ou ECP associados a progesterona durante 7 dias. Além disso, a supressão e recrutamento de uma nova onda foi verificada em 10 ovelhas intactas tratadas com 2 mg de E-17 β e BE em combinação com a progesterona. O perfil de estradiol e FSH apresentaram uma relação hormônio-dependente, no qual, quanto maior a meia-vida da formulação de estradiol utilizada maior o efeito supressor das concentrações de FSH. As doses de E-17 β e BE utilizadas ocasionaram a supressão e recrutamento de uma nova onda folicular, contudo, a utilização de 2 mg de BE atrasou o surgimento da nova onda folicular.

Palavras chave: estradiol-17 β , benzoato de estradiol, cipionato de estradiol, recrutamento da onda, sincronização.

2 ABSTRACT

Estradiol and FSH profile were evaluated in ovariectomized ewes treated with 2 mg of E-17 β , EB or ECP associated with progesterone for 7 days. Furthermore, suppression and recruitment of a new wave was observed in 10 intact sheep treated with 2 mg of E-17 β and EB in combination with progesterone. Estradiol and FSH profile showed a hormone-dependent manner, in which, the higher the half-life of estradiol formulation used the most suppressive effect of FSH concentrations. E-17 β and EB dose resulted in suppression and follicular recruitment of a new wave, however, the use of 2 mg of EB delayed the emergence of the new follicular wave.

Keywords: estradiol-17 β , estradiol benzoate, estradiol cypionate, recruitment wave, synchronization.

3 INTRODUÇÃO

Progesterona (P4) ou progestágenos (acetato de medroxiprogesterona, MAP; acetato de fluorogestona, FGA) durante 12 a 14 dias são amplamente utilizados na sincronização do estro em ovinos (Abecia et al., 2012). No entanto, esses protocolos não sincronizam precisamente o estro e a ovulação (Moreira et al., 2014). As características do momento da ocorrência da ovulação e a sincronia da ovulação podem ser muito inconsistentes quando o estro é sincronizado, e potencialmente levando a uma redução na fertilidade. Além disso, tratamentos com progestágenos (12-14 dias) foram associados à ovulação de folículos envelhecidos e à uma diminuição da fertilidade subsequente (Johnson et al., 1996; Ungerfeld & Rubianes, 1999; Vinales et al., 2001).

Essas limitações poderiam ser contornadas pelo controle do momento da emergência da onda de crescimento folicular durante o protocolo de indução/sincronização do estro. Isto levaria a ovulação de folículos jovens e com o mesmo estágio de desenvolvimento folicular ao final do protocolo. O tratamento de ovelhas cíclicas com implantes liberando concentrações suprafisiológicas de estradiol (E₂) bloqueou o pico sérico do hormônio folículo estimulante (FSH) que precedem as ondas foliculares, e suprimiu a emergência da onda (Barrett et al., 2006; Barrett et al., 2007). Em ovelhas em anestro, uma única aplicação de estradiol-17 β (E-17 β ; 350 μ g/ovelha) 6 dias após o tratamento com MAP, resultou no efeito supressivo sobre o FSH e na emergência de uma nova onda dentro de 4 – 7 dias após o tratamento com estradiol (Barrett et al., 2008). Contudo, o mesmo protocolo hormonal falhou em suprimir e resincronizar a emergência da onda folicular durante a estação reprodutiva (Bartlewski et al., 2015).

Utilizando 0,1 e 0,2 mg de benzoato de estradiol (BE) em ovelhas Suffolk, Takada et al. (2012) não observaram o surgimento de uma nova onda folicular de forma

sincronizada, e nem a supressão do crescimento folicular em 4 dias de protocolo com MAP. Entretanto, tem sido relatado em bovinos, que outros ésteres de estradiol, como o BE e o valerato de estradiol (VE) causam uma supressão prolongada das concentrações de FSH e um atraso no surgimento da onda folicular. Além disso, o intervalo entre o tratamento até a emergência da onda folicular parece ser dependente de ambas a preparação e dose de estradiol (Martinez et al., 2005), assim como, do ressurgimento da secreção do FSH (O'Rourke et al., 2000). Talvez baixas doses de BE por um curto período não foram suficientes para causar a supressão folicular e o recrutamento de uma nova onda em ovinos. Entretanto, não se é conhecido quais outros efeitos seriam também induzidos pela administração de doses maiores de E-17 β ou de seus ésteres sobre a secreção de gonadotrofina e desenvolvimento folicular em ovelhas cíclicas.

Os efeitos do E-17 β sobre a liberação de gonadotrofinas em ovelhas em anestro tratadas com progesterona/progestágeno (Barrett et al., 2008; Ungerfeld, 2009) e do E-17 β , BE, VE ou cipionato de estradiol (ECP) em novilhas ou vacas tratadas com progesterona/progestágeno (Bo et al., 1995; Bo et al., 2000; Martinez et al., 2000; Garcia e Salaheddine, 2001; Colazo et al., 2003; Martinez et al., 2005; Sa Filho et al., 2011) têm sido relatados. Embora do E-17 β , BE, VE e ECP têm sido utilizados em protocolos de sincronização do estro em bovinos, uma comparação contemporânea dos efeitos de do E-17 β , BE ou ECP sobre as concentrações de gonadotrofinas, e o uso das mesmas doses utilizadas em vacas destas preparações de estradiol em ovelhas cíclicas intactas tratadas com progesterona (P4), ainda não foram estudadas. Uma maior compreensão das semelhanças e diferenças entre as várias formas de estradiol sobre a regulação hormonal do desenvolvimento folicular tem contribuído para o desenvolvimento de novos tratamentos de sincronização do estro (revisado por [Macmillan et al., 2003]) e consistentemente resultou em altas taxas de gestação após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos, independentemente da fase do ciclo estral (revisado por [Mapletoft et al., 2003]). Espera-se que o mesmo ocorra em ovelhas, mas isto não foi profundamente estudado como foi em bovinos. Portanto, estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar as implicações do uso destes hormônios em ovinos.

Assim, com base nos perfis farmacocinéticos das diferentes formulações de estradiol, dois experimentos foram realizados para avaliar os efeitos do tratamento com diferentes formulações de estradiol sobre a liberação de gonadotrofina e dinâmica folicular ovariana em ovelhas ovariectomizadas e intactas, respectivamente. No Experimento 1 objetivou-se determinar os perfis plasmáticos de E₂ e FSH em ovelhas ovariectomizadas tratadas com P4 que receberam três formulações de estradiol diferentes. No Experimento 2

objetivou-se comparar a eficácia do E-17 β e BE na sincronização da emergência da onda folicular em animais intactos tratados com P4.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo CEUA-Cenargen 261/2015).

4.1 Animais

O experimento foi realizado em Brasília, DF, Brasil, de agosto a novembro de 2014. A região está a 15°47'S, 47°55'W; altitude média de 1.080 m. O clima é tropical (Aw na classificação de Köppen) com uma precipitação anual entre 1.300 e 1.600 mm e temperatura média anual de 19 até 20°C (Alvares et al., 2013). Ovelhas da raça Santa Inês, sexualmente maduras e clinicamente saudáveis, foram mantidas em baias de confinamento. Elas foram alimentadas com uma dieta de manutenção de feno de *Cynodon sp.* e silagem de milho, com acesso *ad libitum* à água e sal mineral.

4.2 Experimento 1

Seis ovelhas da raça Santa Inês (3-5 anos de idade) ovariectomizadas foram tratadas com a inserção de um dispositivo interno de liberação de progesterona (EAZI-BREED

CIDR[®]; InterAg, Hamilton, Nova Zelândia) durante 7 dias. Vinte e quatro horas após a inserção da P4, os animais foram selecionados aleatoriamente para receber um dos três tratamentos; (1) 2 mg de estradiol-17 β (E-17 β ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; n = 2) em óleo de gergelim (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), (2) 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Hertape Calier Saúde Animal, SA, MG, Brasil; n = 2), e (3) 2 mg de cipionato de estradiol (E.C.P[®] - Zoetis[™], Florham Park, NJ, EUA; n = 2) todos administrados por via intramuscular. Este experimento foi conduzido em três repetições, com pelo menos 30 dias de intervalo, seguindo um delineamento *cross-over*, em que todos os animais foram submetidos a todos os tratamentos, totalizando ao final do experimento 6 animais por tratamento.

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular em tubos vacutainer de 10 ml contendo heparina Na₂ (BD Vacutainer[®] Plus Plastic Tubes, Franklin Lakes, NJ, USA). As amostras foram colhidas um pouco antes da inserção da P4 (-24h), antes da administração de estradiol (0h), 2 horas após (2h), e, em seguida, em intervalos de 6 h para as primeiras 48 h após a administração de estradiol, e em intervalos de 12 horas, até a remoção da P4. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas durante 20 min a 1500 x g. Após a separação, o plasma foi armazenado a -20°C até serem analisadas para E₂ e FSH. A concentração de E₂ e FSH no pré-tratamento foram obtidas da avaliação hormonal da primeira amostra de sangue coletada. A concentração do pico hormonal de E₂ foi definida como a concentração de estradiol observada no vértice do pico. A concentração do nadir do hormônio folículo estimulante foi definida como a concentração mais baixa de FSH observada.

As concentrações séricas de E₂ foram mensuradas usando um kit RIA de fase sólida com tubos revestidos com anticorpos (Ultra-Sensitive Estradiol RIA, DSL4800; Immunotech[®], Beckman Coulter Company, Marsielle, France). A sensibilidade do teste foi de 2,2 pg/mL, e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 8,9% e 12,2%, respectivamente. As concentrações plasmáticas de FSH foram mensuradas usando um kit RIA validado para a FSH bovino usando USDA-bFSH para padrões de iodação e de referência, e NIDDK anti-soro anti-oFSH. A sensibilidade dos testes foi de 0,025 ng/mL e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 10,55% e 13,22%, respectivamente.

4.3 Experimento 2

Dez ovelhas da raça Santa Inês foram tratadas com a inserção de um dispositivo interno de liberação de progesterona (EAZI-BREED CIDR[®]). Vinte e quatro horas após a inserção da P4, os animais foram selecionados aleatoriamente para receber um dos dois tratamentos; (1) 2 mg de estradiol-17 β (E-17 β ; n = 5), (2) 2 mg de benzoato de estradiol (BE; n = 5). A P4 foi mantida até a observação, por ultrassonografia transretal, da atresia do folículo dominante da nova onda folicular recrutada (ou seja, a onda folicular que surgiu após a administração do E-17 β ou BE).

A dinâmica folicular foi monitorada a cada 12 h por ultrassonografia transretal dos ovários, desde o dia da inserção da P4 até o dia da retirada da P4. Foi utilizado um *scanner* modo-B em tempo-real (DP-2200Vet; Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd, Nanshan, Shenzhen, PR China) com um transdutor linear multifrequencial em frequência de 7,5 MHz, endurecido com um cano de plástico adaptado. As ovelhas foram submetidas a exame de ultrassom, enquanto contidas em estação com auxílio de um tronco de contenção. Esta técnica tem sido validada para o monitoramento dinâmica folicular ovariana e detecção de corpo lúteo (CL) em ovinos (Viñoles et al., 2004). Todos os exames foram realizados por um operador experiente. Os folículos ovarianos e os CL foram medidos utilizando compassos de calibre eletrônicos internos, bem como o número, diâmetro e localização topográfica da CL e todos os folículos antrais ≥ 2 mm foram esboçados em mapas dos ovários. O volume do corpo lúteo foi medido pela fórmula do cilindro (Silva et al., 2015).

Interpretação da dinâmica folicular foi adaptado sob o critério relatado por Bartlewski et al. (1999). O dia de regressão completa do maior folículo foi adotado como o dia em que o maior folículo do ovário presente no início do tratamento atingiu 3 mm depois da administração de estradiol. A onda folicular foi definida como um grupo de pequenos folículos que deram origem a um ou mais folículos ≥ 4 mm de diâmetro. Para cada onda folicular, o dia do surgimento foi definido como o dia em que o maior folículo (MF) atingiu 3 mm de diâmetro, seguido por um aumento do seu diâmetro no dia seguinte. As seguintes características das ondas foliculares foram determinadas para cada ovelha: (1) diâmetro do maior folículo no momento da inserção da P4; (2) diâmetro do maior folículo no momento do tratamento com estradiol; (3) diâmetro do maior folículo da nova onda emergida; (4) volume do CL no momento do tratamento estradiol; (5) volume do CL no momento do diâmetro máximo do maior folículo; (6) intervalo entre o tratamento com estradiol até a regressão de maior folículo (7) intervalo entre o tratamento com estradiol até o dia da emergência da onda; (8) intervalo entre o tratamento de estradiol até a regressão da nova onda emergida; (9) taxa de crescimento do maior

folículo; e (10) duração do crescimento folicular, fase estática, bem como comprimento da onda.

A fase de crescimento foi definida como o tempo levado pelo folículo para crescer de 3 mm até o seu tamanho máximo; a taxa de crescimento foi calculada pela divisão do crescimento folicular (diâmetro máximo - 3 mm) pela fase de crescimento; a fase estática foi definida como o tempo entre o fim da fase de crescimento folicular até ao início da regressão folicular; e o comprimento de onda foi obtido pela diferença do tempo entre o fim da fase estática e o dia surgimento da nova onda. Durante a fase estática, quando foi observada a redução folicular em duas avaliações ultrassonográfica consecutivas, o tempo da primeira avaliação com redução foi determinada como início da regressão folicular.

4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando software estatístico R (R Core Team, 2014). Todos os valores estão descritos em médias \pm desvio padrão (D.P.) e a significância estatística foi definida como $P \leq 0,05$. As concentrações plasmáticas de E_2 e FSH em amostras colhidas durante o Experimento 1 foram analisadas para efeitos do tempo, do tratamento e interação em um modelo linear (lm) fixado através do teste de análise de variância para medidas repetidas (anova). As concentrações médias diárias de estradiol e de FSH foram analisadas por um teste de ANOVA (aov) e posteriormente pelo teste de Duncan (duncan.test) quando os dados eram paramétricos, e pelo teste de Kruskal-Wallis (kruskal) quando não paramétricos.

A mudança nas concentrações de E_2 e FSH foram avaliadas por análise de regressão segmentada (reg_seg) em um modelo linear (lm) fixado, juntamente com a análise para a existência de pontos de quebra para avaliar possíveis diferenças nos padrões das concentrações hormonais durante o tempo estudado. A comparação entre as características nas concentrações plasmáticas de estradiol e de FSH no Experimento 1, e entre os tratamentos E-17 β e BE no Experimento 2, para os dados foliculares e luteais foram realizados pelo método de *bootstrap* utilizando um processo de reamostragem com substituição em 10.000 simulações.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

Houve efeito do tratamento ($P < 0,001$), tempo ($P < 0,001$) e interação entre o tratamento e o tempo ($P < 0,001$; Figura 1) sobre as médias da concentração plasmática de estradiol. Uma mudança na concentração média de E_2 no grupo E-17 β foi caracterizada por um aumento drástico ($P < 0,001$) às 2 horas após o tratamento, seguido por uma diminuição gradual, com padrão diferente dos outros grupos. A média plasmática da concentração de E_2 aumentou ($P < 0,05$) para $923,9 \pm 258,0$ pg/mL às $3,3 \pm 2,1$ h no grupo E-17 β , para $220,5 \pm 117,4$ pg/mL às $20,0 \pm 9,0$ h no grupo BE e $102,5 \pm 57,5$ pg/mL às $41,3 \pm 39,1$ h no grupo ECP. A concentração do pico de estradiol foi maior ($P < 0,001$) em ovelhas tratadas com E-17 β , do que nos outros dois grupos, enquanto a concentração do pico foi maior no grupo BE do que no grupo ECP ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Às 12 h o grupo E-17 β atingiu a média da concentração plasmática de estradiol similar ao BE, e ambos estavam mais altos ($P < 0,01$) do que no grupo ECP. O grupo BE permaneceu com a média da concentração plasmática de E_2 mais alta ($P < 0,05$) do que o grupo ECP às 18 h, enquanto o E-17 β teve valores semelhantes aos dois outros grupos ($P > 0,05$). Entre 24 e 48 h os três grupos permaneceram semelhantes ($P > 0,05$). O grupo E-17 β atingiu concentração basal de estradiol às 60 h, permanecendo inferior aos outros grupos ($P < 0,05$). A mesma diferença foi observada às 72 e 84 h após o tratamento. Após 84 h houve uma redução na média da concentração plasmática de estradiol no grupo BE resultando em concentrações semelhantes ao grupo E-17 β às 96 e 108 h ($P > 0,05$), atingindo concentração basal às 120 h. No grupo ECP, a média da concentração plasmática de estradiol permaneceu maior ($P < 0,05$)

comparado aos outros grupos das 96 até as 144 h e não atingiu concentração basal até o fim do tratamento (Figura 1).

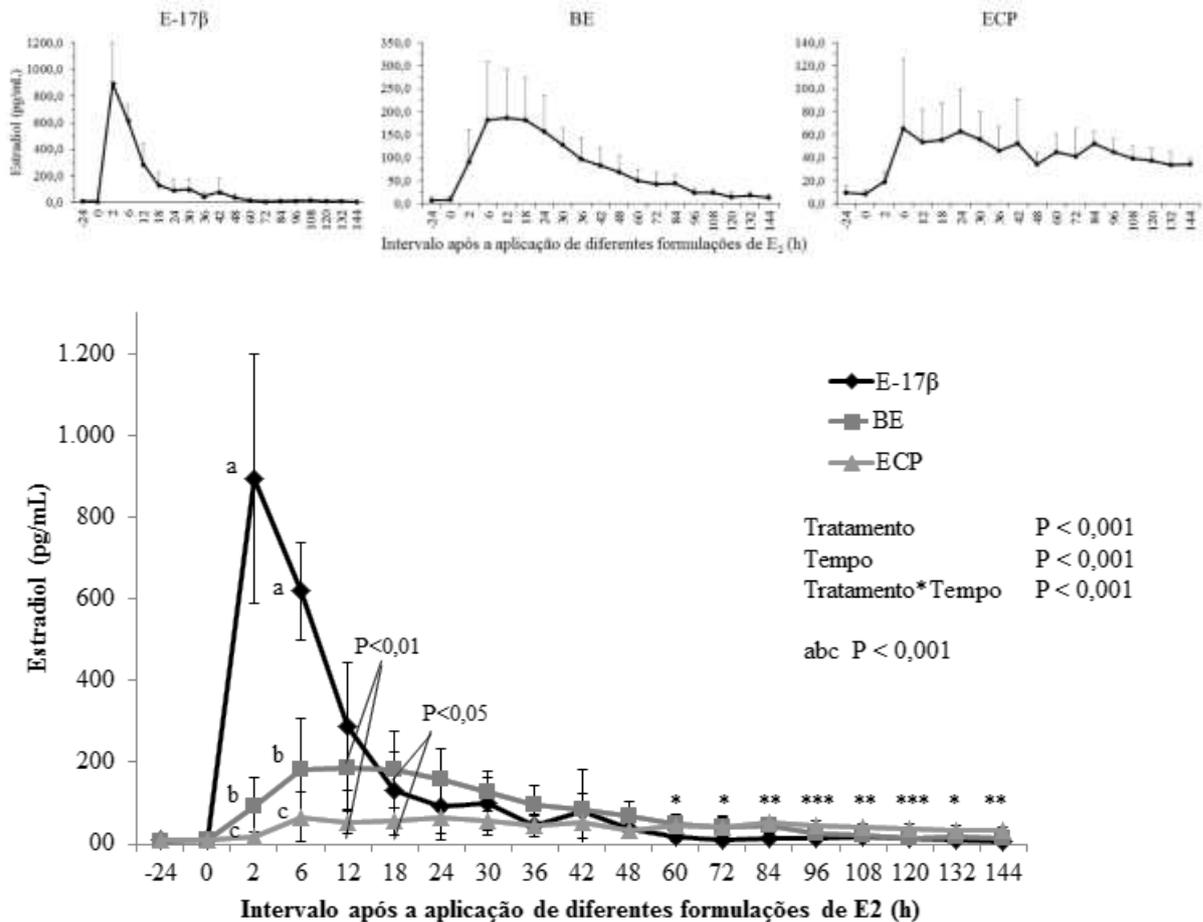


Figura 1. Média (\pm D.P.) da concentração plasmática de estradiol, em cada grupo individualmente ou com os três tratamentos agrupados, em ovelhas ovariectomizadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona novo no dia 0 (-24 h) e 2 mg de estradiol-17 β (\blacklozenge E-17 β ; n = 6), benzoato de estradiol (\blacksquare BE; n = 6) ou cipionato de estradiol (\blacktriangle ECP; n = 6) no Dia 1 (0 h). O pessário vaginal com P4 foi removido no Dia 7 (144 h; Experimento 1). Os asteriscos indicam diferenças entre os grupos ($P \leq 0,001$ ***; $P \leq 0,01$ **;
 $P \leq 0,05$ *).

Houve efeito do tratamento ($P < 0,001$), tempo ($P < 0,001$) e interação entre o tratamento e o tempo ($P = 0,0017$; Figura 2) sobre a média da concentração plasmática de FSH. Não houve efeito do tratamento ($P > 0,05$) sobre a concentração plasmática de FSH das 24 à 84 h. Às 96 h a média da concentração plasmática de FSH no grupo ECP foi semelhante aos outros dois grupos e foi maior ($P < 0,05$) no grupo E-17 β comparado ao grupo BE. Durante as 108 h até o final do tratamento (144 h) a média da concentração plasmática de FSH foi maior ($P <$

0,05) no grupo E-17 β do que nos grupos BE e ECP, permanecendo semelhante nos dois últimos ($P > 0,05$; Figura 2).

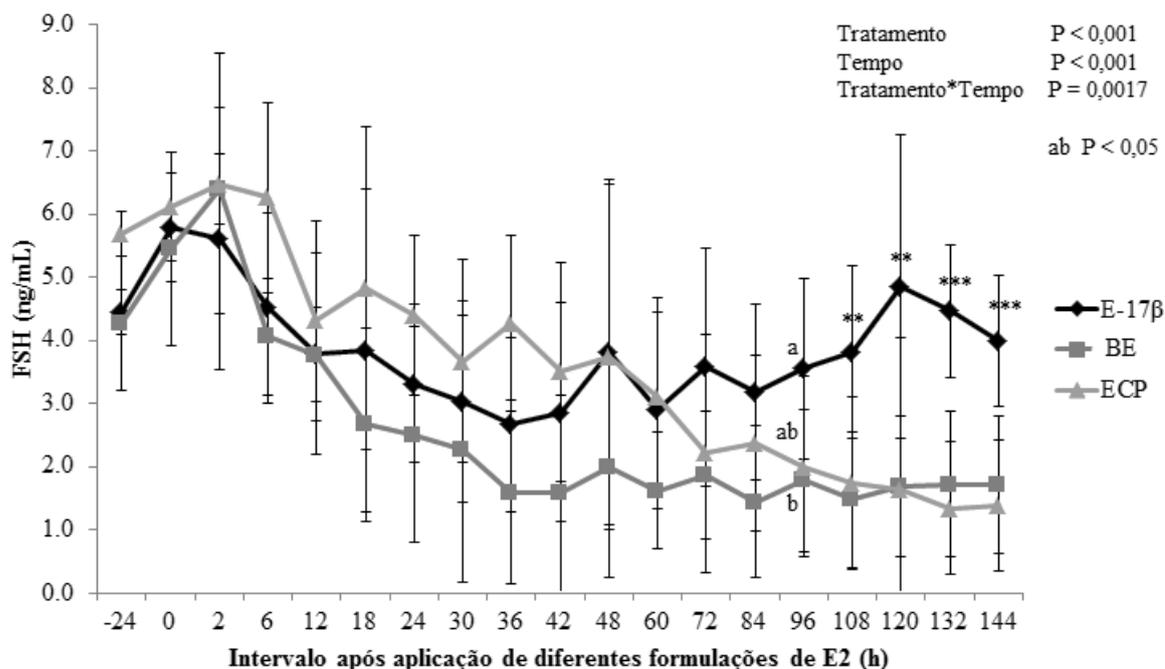


Figura 2. Média (\pm D.P.) da concentração plasmática de FSH em ovelhas ovariectomizadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona novo no dia 0 (-24 h) e 2 mg de estradiol-17 β (\blacklozenge E-17 β ; $n = 6$), benzoato de estradiol (\blacksquare BE; $n = 6$) ou cipionato de estradiol (\blacktriangle ECP; $n = 6$) no Dia 1 (0 h). O pessário vaginal com P4 foi removido no Dia 7 (144 h; Experimento 1). Os asteriscos indicam diferenças entre os grupos ($P \leq 0,001$ ***; $P \leq 0,01$ **;
 $P \leq 0,05$ *).

A concentração plasmática de FSH reduziu ($P < 0,05$) para $2,4 \pm 1,2$ ng/mL às $47,0 \pm 15,4$ h no grupo E-17 β , para $0,9 \pm 0,9$ ng/mL às $50,0 \pm 24,8$ h no grupo BE e $1,3 \pm 0,5$ ng/mL às $132,0 \pm 7,6$ h no grupo ECP. A concentração de FSH no nadir foi maior ($P < 0,05$) em ovelhas tratadas com E-17 β , do que com BE, enquanto a concentração do nadir de ambos foi semelhante à aplicação de ECP ($P > 0,05$) (Tabela 1). Entretanto, o tempo para atingir o nadir foi maior no grupo ECP do que nos outros dois grupos ($P < 0,001$; Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da administração de estradiol-17 β (E-17 β), benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (ECP) sobre as características da concentração plasmática de estradiol e FSH (média \pm D.P.) em ovelhas ovariectomizadas sincronizadas com P4

Variável	Grupos		
	E-17 β	BE	ECP
Concentração de E ₂ no pré-tratamento (pg/mL)	10,6 \pm 4,3	6,5 \pm 7,5	9,6 \pm 6,3
Concentração do pico de E ₂ (pg/mL)	923,9 \pm 258,0 ^a	220,5 \pm 117,4 ^b	102,5 \pm 57,5 ^c
Nº de horas para atingir a concentração máxima de E ₂ *	3,3 \pm 2,1 ^a	20,0 \pm 9,0 ^{ab}	41,3 \pm 39,1 ^b
Concentração de FSH no pré-tratamento (ng/mL)	4,4 \pm 0,4 ^{ab}	3,6 \pm 1,3 ^a	5,7 \pm 1,4 ^b
Concentração do nadir de FSH (ng/mL)	2,4 \pm 1,2 ^a	0,9 \pm 0,9 ^b	1,3 \pm 0,5 ^{ab}
Nº de horas para atingir o nadir de FSH*	47,0 \pm 15,4 ^a	50,0 \pm 24,8 ^a	132,0 \pm 7,6 ^b

Dentro da mesma linha, médias com diferentes sobrescritos (a, b, c) são diferentes (P < 0,05)

*Hora 0 = momento da administração de estradiol

A análise de regressão segmentada (Figura 3) apresentou dois pontos de quebra no grupo E-17 β (\approx 2h e \approx 42 h) e no grupo BE (\approx 6h e \approx 18 h), e um ponto de quebra no grupo ECP (\approx 6 h) na concentração plasmática de estradiol. Os pontos de quebra indicam que houve uma mudança no padrão de comportamento do perfil plasmático hormonal nos grupos E-17 β (aumento-diminuição-estabilidade), BE (aumento-estabilidade-diminuição) e ECP (aumento-diminuição). Nos grupos BE e ECP houve um aumento nas concentrações circulantes de estradiol em até 6 horas, e a partir deste momento os dois grupos apresentaram padrões diferentes. No grupo BE, concentrações circulantes de estradiol permaneceram consistentemente altas até às 18 horas, seguindo por uma queda menos proeminente em relação ao grupo E-17 β , entretanto, mais acentuada do que no grupo ECP. No grupo ECP, após atingir o pico da concentração de estradiol às 6 horas, esse permaneceu quase constante, sendo observado um pequeno decréscimo ao longo do tempo. Enquanto que na concentração plasmática de FSH, somente os grupos E-17 β (\approx 36 h; diminuição-aumento) e BE (\approx 60 h; diminuição-estabilidade) mostraram mudanças hormonais, com um ponto de quebra em cada e nenhum ponto de quebra foi observado no grupo ECP (diminuição).

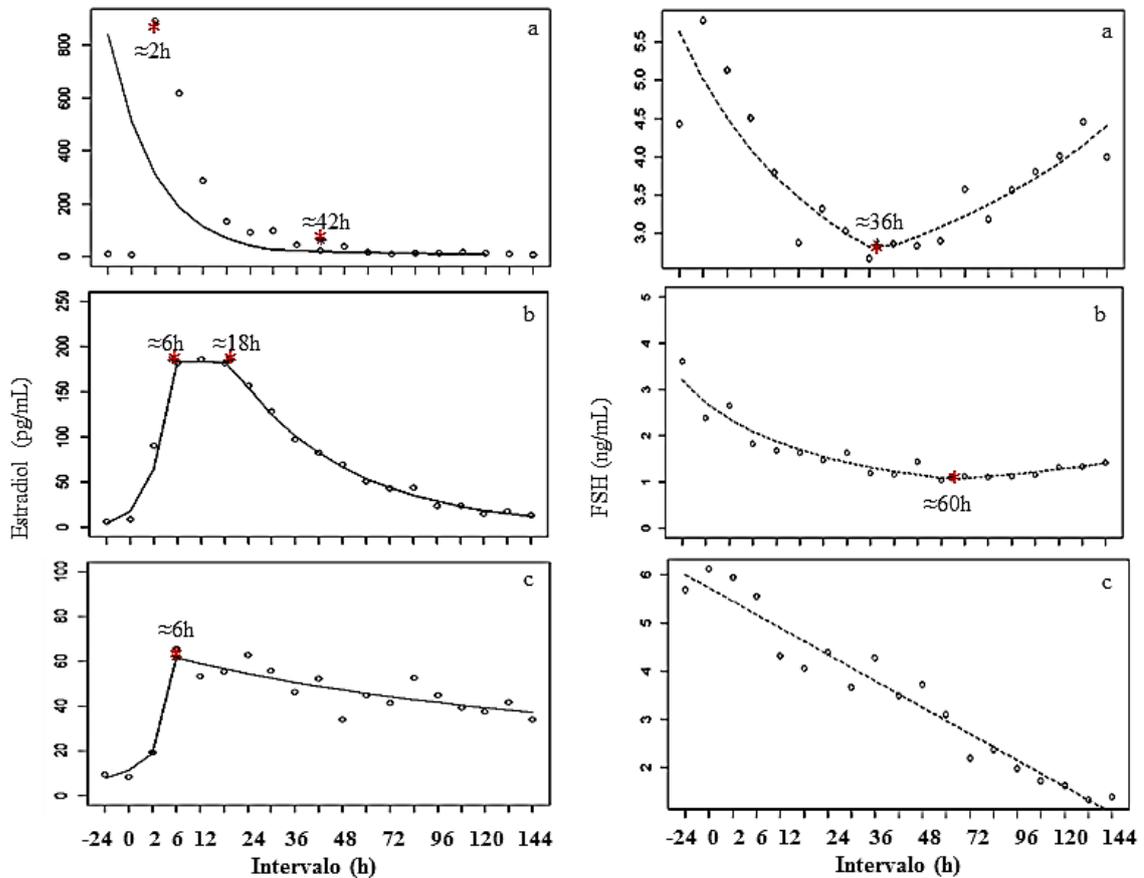


Figura 3. Regressão segmentada e pontos de quebra (*) da concentração plasmática de E₂ e FSH em ovelhas ovariectomizadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona novo no Dia 0 (-24 h) e 2 mg de (a) estradiol-17 β (E-17 β ; n = 6), (b) benzoato de estradiol (BE; n = 6) ou (c) cipionato de estradiol (ECP; n = 6) no Dia 1 (0 h). O pessário vaginal com P4 foi removido no Dia 7 (144 h; Experimento 1).

5.2 Experimento 2

No momento da inserção da P4, todas as ovelhas tinham um folículo com diâmetro médio ou grande (ou seja, ≥ 4 mm; Figura 4) e pelo menos um corpo lúteo. Os perfis morfológicos da avaliação ultrassonográfica do diâmetro e padrão de regressão do maior

folículo presente no ovário durante o tratamento e o padrão de desenvolvimento do maior folículo que emergiram depois de iniciado o tratamento estão apresentados na Figura 4.

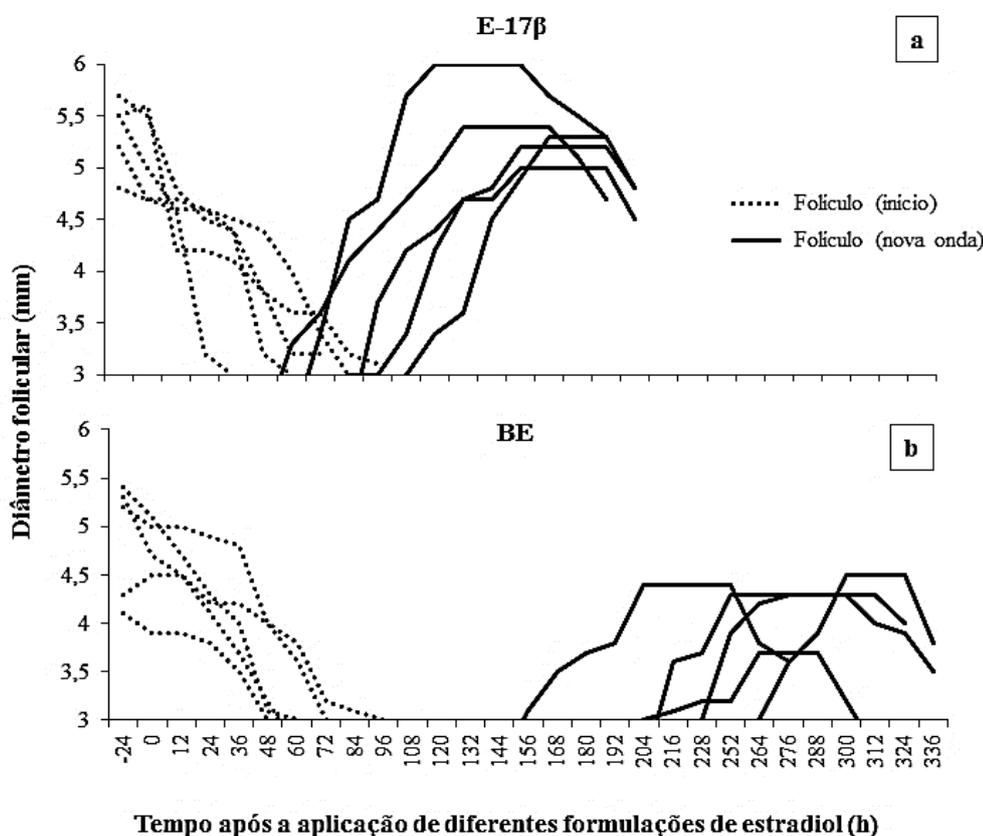


Figura 4. Identificação individual dos perfis de diâmetro (≥ 3 mm) das estruturas ovarianas (folículos) presentes em cada ovelha ($n = 10$) durante o protocolo de sincronização, com início no dia em que o dispositivo de progesterona foi inserido (Dia 0) e terminando no dia da regressão do folículo recrutado na nova onda (Experimento 2). A linha tracejada representa o padrão de regressão do maior folículo presente durante o tratamento. A linha contínua representa o padrão de aparecimento, crescimento e regressão do maior folículo que se desenvolveu após o início do tratamento. O painel (a) representa o grupo E-17 β ($n = 5$); O painel (b) representa o grupo BE ($n = 5$).

Não houve diferença ($P > 0,05$) no diâmetro do maior folículo e no volume do corpo lúteo entre os tratamentos no início do protocolo hormonal. Houve um efeito da formulação de estradiol ($P = 0,04$) sobre o diâmetro do maior folículo da nova onda emergida; ovelhas que receberam E-17 β tiveram um folículo maior ($5,4 \pm 0,4$ mm) do que as que receberam BE ($4,2 \pm 0,3$ mm; Tabela 2). Após o início do tratamento, ambos os grupos tiveram

o mesmo ($P > 0,05$) intervalo médio (dias) do tratamento até a completa regressão do maior folículo presente nos ovários. O intervalo médio entre o tratamento de E2 para a emergência da nova onda e início de sua regressão ocorreu significativamente mais cedo para o grupo E-17 β ($4,0 \pm 0,8$ e $8,5 \pm 0,7$ dias, respectivamente) do que no grupo BE ($8,9 \pm 1,5$ e $12,3 \pm 1,2$ dias, respectivamente) (Tabela 2; Figura 4). Não houve diferença entre os tratamentos, na dispersão entre a variação do tratamento de estradiol até a regressão do maior folículo ($P = 0,73$), emergência ($P = 0,25$) e regressão da nova onda ($P = 0,37$). A fase de crescimento e o comprimento da onda foram maiores no grupo E-17 β do que no grupo BE ($P < 0,01$). Não houve diferença na taxa de crescimento e na fase estática da nova onda folicular entre ovelhas tratadas com E-17 β ou BE ($P > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm D.P.) das características foliculares e luteais em ovelhas deslanadas que receberam um dispositivo de liberação de progesterona um dia antes do tratamento com 2 mg de estradiol-17 β (E-17 β) ou 2 mg de benzoato de estradiol (BE)

Variável	Grupos	
	E-17 β	BE
Número de ovelhas	5	5
Diâmetro máximo (mm)		
MF na inserção da P4	$5,3 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,6$
MF no tratamento de estradiol	$5,0 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,5$
MF da nova onda	$5,4 \pm 0,4^a$	$4,2 \pm 0,3^b$
Volume (mm ³)		
CL no tratamento de estradiol	$447,1 \pm 193,7$ (5/5)	$361,4 \pm 120,0$ (5/5)
CL no máximo diâmetro do MF da nova onda emergida	$499,5 \pm 56,6$ (3/5)	$422,6 \pm 88,9$ (4/5)
Dia da regressão do MF*		
Média (\pm D.P.)	$3,0 \pm 1,0$	$2,7 \pm 0,8$
Variação	1,5 – 4,0	2,0 – 4,0
Dia da emergência da onda*		
Média (\pm D.P.)	$4,0 \pm 0,8^a$	$8,9 \pm 1,5^b$
Variação	3,0 – 5,0	6,5 – 10,5
Dia da regressão da nova onda*		
Média (\pm D.P.)	$8,5 \pm 0,7^a$	$12,3 \pm 1,2^b$
Variação	7,5 – 9,0	10,5 – 13,5
Taxa de crescimento (mm/dia)	$0,8 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$
Fase de crescimento (dia)	$2,6 \pm 0,4^a$	$1,6 \pm 0,4^b$
Comprimento da onda (dia)	$4,5 \pm 0,5^a$	$3,5 \pm 0,5^b$
Fase estática (dia)	$1,9 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,4$

Dentro da mesma linha, médias com diferentes sobrescritos (a, b) são diferentes ($P < 0,05$)

*Dia 0 = dia da administração de estradiol; MF = maior folículo

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que comparou os perfis hormonais de estradiol e FSH em ovelhas ovariectomizadas pré-tratadas com P4, em combinação com uma dose de E-17 β ou de seus ésteres e comparando a dinâmica das ondas foliculares em ovelhas cíclicas pré-tratadas com estes hormônios. Neste experimento foram demonstrados distintos perfis de estradiol e de FSH após a administração de doses elevadas de E-17 β , BE ou ECP em ovelhas ovariectomizadas (Experimento 1) e o desenvolvimento folicular ovariano após a administração de doses elevadas de E-17 β ou BE em ovelhas cíclicas (Experimento 2).

O E-17 β é a forma mais natural das formulações de estradiol aqui estudadas e a que possui a ação mais potente (O'rourke et al., 2000). Talvez por esse motivo, este hormônio seja o mais estudado em ovinos (Meikle et al., 2001; Barrett et al., 2006; Barrett et al., 2007; Ungerfeld, 2009; Bartlewski et al., 2015), contudo, este não está comercialmente disponível no Brasil. Entretanto, os ésteres como o benzoato de estradiol e o cipionato de estradiol estão disponíveis no mercado para o uso veterinário. Muitos estudos foram realizados em bovinos, ao longo dos anos, para avaliar a resposta e a similaridade dos ésteres de estradiol com o E-17 β , porém, esses mesmos estudos ainda não foram conduzidos em ovinos a fim de viabilizar a utilização destes hormônios em um protocolo de sincronização do estro ou de superovulação.

A concentração plasmática de estradiol no início do protocolo está de acordo com dados da literatura em ovelhas ovariectomizadas não tratadas com estradiol (Rawlings et al., 1984). Os resultados deste experimento da dinâmica de absorção e metabolização hormonal, e da concentração do pico de estradiol apresentaram similaridades com a utilização do estradiol-17 β na sincronização do estro em bovinos (Bo et al., 2000), assim como já era esperado. O perfil plasmático da concentração de estradiol durante todo o protocolo dependeu da formulação de estradiol utilizada, mostrando diferentes padrões de comportamento hormonal ao longo do

tempo, na análise de regressão segmentada (Figura 3) entre os três estradióis estudados. Para que um padrão semelhante ao obtido pelo E-17 β (aumento-diminuição-estabilidade) fosse observado no BE e ECP, hipoteticamente seria necessária a redução nas doses dos ésteres de estradiol, uma vez que a concentração plasmática de estradiol apresenta uma resposta dose-dependente (O'rourke et al., 2000).

A média da concentração plasmática de estradiol no pico foi consideravelmente maior no grupo E-17 β do que nos grupos BE e ECP, seguido por uma diminuição para concentrações basais em aproximadamente 60 horas no grupo E-17 β e 120 horas no grupo BE. Os grupos BE e ECP, apesar de terem apresentado a concentração do pico de E₂ 4,2 e 9,0 vezes menores, respectivamente, do que o grupo E-17 β , ambos mantiveram concentrações circulantes de E₂ por um tempo mais prolongado em relação ao E-17 β . Entretanto, no grupo ECP isto ocorreu de uma forma bem mais expressiva do que nos outros grupos, fazendo com que não atingisse as concentrações basais até o fim do tratamento, por isso, esse hormônio não foi utilizado no Experimento 2. Os resultados deste estudo demonstraram claramente, nas concentrações plasmáticas de estradiol, que os ésteres de estradiol, tais como BE e ECP, tem um tempo de vida mais prolongado em comparação com o E-17 β também em ovelhas ovariectomizadas, assim como foi visto em bovinos (Bo et al., 1993; Bo et al., 2000; O'rourke et al., 2000; Colazo et al., 2003; Martinez et al., 2005). Além disso, que o ECP apresenta uma maior meia vida em relação ao BE, assim como verificado em mulheres que receberam 5 mg de diferentes ésteres de estradiol (Oriowo et al., 1980).

O estradiol é um dos hormônios responsáveis pela regulação da secreção de FSH por meio de um mecanismo de *feedback* negativo (Baird et al., 1991; Mann et al., 1992). Esse mecanismo é potencializado pela combinação do estradiol com progesterona/progestágeno, resultando em uma maior supressão das concentrações séricas de FSH (Rawlings et al., 1984; Bo et al., 1994; Barrett et al., 2008). No presente estudo, a mudança no padrão de absorção e metabolização das formulações de estradiol utilizadas resultou em diferentes efeitos sobre as concentrações de FSH, assim como foi observado em bovinos (Martinez et al., 2005). Entretanto, o *feedback* negativo, ocasionado pela associação da progesterona com os ésteres de estradiol, resultou em uma supressão do FSH muito mais potente em ovinos do que em bovinos, uma vez que, em ovinos a dose de 2 mg de BE utilizada ocasionou no bloqueio do aumento das concentrações de FSH até o final do tratamento e em bovinos o bloqueio ocorreu de forma transitória, de modo que as concentrações de FSH começaram a aumentar mesmo com alta concentração sérica de estradiol (O'rourke et al., 2000).

As concentrações médias de FSH no pré-tratamento sofreram redução de 46%, 75% e 77% nos grupos E-17 β , BE e ECP, respectivamente, em relação à média da concentração de FSH no nadir. Além disso, a dose de 2 mg de E-17 β ou BE ou ECP administrada em combinação com a progesterona, suprimiu a concentração plasmática de FSH em ovelhas ovariectomizadas por pelo menos \approx 36 h no grupo E-17 β e 144 h nos grupos BE e ECP (Figura 3). O grupo BE exerceu um efeito supressivo maior sobre a média da concentração de FSH no nadir do que o grupo E-17 β . Entretanto, o mesmo não ocorreu no grupo ECP em relação ao E-17 β . A média dos valores mínimos alcançados no grupo ECP, considerados como nadir, não diferiu do valor obtido no grupo E-17 β . Contudo, devido a maior meia vida do ECP, as concentrações de E₂ se mantiveram elevadas ao longo de todo experimento e os valores obtidos da concentração de FSH ainda se encontravam em uma queda constante (Figura 3). Portanto, o tempo do experimento não permitiu avaliar com precisão o valor do nadir na utilização de 2 mg de ECP associado a progesterona. Deste modo, somente o grupo E-17 β apresentou uma supressão transitória, e essa diferença no padrão de supressão pode ter ocorrido devido à maior duração média das concentrações elevadas de estradiol no grupo BE e ECP, o que acarretou em um período maior de supressão e com um efeito mais potente, sobre as concentrações plasmáticas de FSH.

A supressão das concentrações de FSH, utilizando protocolos com associação de estradiol e progesterona, foi relacionada com a regressão da onda folicular presente no ovário e recrutamento de uma nova onda de forma sincronizada (Bo et al., 2000; Martinez et al., 2005; Barrett et al., 2008). Em bovinos, para que ocorra a regressão do folículo dominante, o aumento nas concentrações circulantes de E₂ durante um período entre 12 a 24 horas é suficiente, contudo, esta não ocorre quando a concentração de estradiol é mantida por apenas 10 horas (Bo et al., 2000). Em ovinos, durante o período de anestro, a utilização de 0,35 mg de E-17 β + MAP manteve a concentração sérica de E₂ por pelo menos 12 horas, o que resultou na regressão folicular e recrutamento de uma nova onda (Barrett et al., 2008). Entretanto, resultado igual não foi observado utilizando a mesma dose de E-17 β , em ovelhas cíclicas tratada com P4 ou MAP (Bartlewski et al., 2015).

No presente experimento, a concentração circulante de E-17 β reduziu em aproximadamente 42 horas (Figura 3) e somente obteve concentrações estatisticamente próximas à basal às 60 horas (Figura 1). Esse período (Experimento 1) foi suficiente para causar a regressão folicular e recrutamento de uma nova onda (Experimento 2) em ovelhas cíclicas. Contudo, ficou evidente que a dose utilizada neste experimento foi elevada, o que resultou num tempo mais longo que o requerido para a regressão dos folículos ovarianos. Possivelmente em

ovelhas cíclicas seja necessário um período de manutenção das concentrações de estradiol elevadas maior que 12 horas e inferior a 42 horas, e para isso a dose ideal estaria entre 0,35 mg e 2 mg de E-17 β .

A concentração de E₂ alcançada pelo grupo BE resultou no mesmo padrão do grupo E-17 β na regressão do maior folículo presente no ovário no início do tratamento. Devido ao prolongamento da exposição à progesterona no Experimento 2, o BE foi capaz de recrutar uma nova onda com a mesma sincronia que o E-17 β . Entretanto, o efeito supressivo maior do BE atrasou o recrutamento da nova onda em aproximadamente 4,9 dias. Foi interessante notar que uma ovelha do grupo BE apresentou comportamento de ninfomania do 2^o ao 5^o dia após a aplicação do tratamento, além disso, 80% dos animais do mesmo grupo apresentaram folículos ≤ 2 mm entre os dias $5,25 \pm 0,5$ até $8,6 \pm 0,6$ (média \pm D.P.), que apareciam e desapareciam entre uma avaliação e outra, muitas vezes não sendo observado nenhum folículo presente no ovário.

Barrett et al. (2006) observaram que a média da concentração basal de FSH em ovelhas tratadas com implantes grandes com 10% estradiol-17 β ($1,91 \pm 0,13$ ng/mL) não sofreram modificações em relação ao grupo controle ($1,48 \pm 0,17$ ng/mL; sem estradiol), e que devido a isso, a presença de implantes grandes não influenciou a resposta do número de folículos do grupo de pequenos folículos (2-3 mm de diâmetro). No presente estudo, o BE obteve resultado no nadir de FSH ($0,9 \pm 0,9$) inferior ao obtido por esses autores, o que associado ao maior efeito supressivo sobre as concentrações de FSH por um tempo prolongado, resultou em uma mudança no padrão de resposta em relação ao grupo de pequenos folículos presentes no ovário, ao longo do tratamento, evidenciando que a dose utilizada foi muito elevada.

A onda folicular em ovelhas é precedida por um aumento transitório nas concentrações de FSH que estimula a emergência da onda folicular (Souza et al., 1998; Bister et al., 1999; Gibbons et al., 1999; Bartlewski et al., 2000; Evans et al., 2002). A emergência da nova onda folicular ocorreu em aproximadamente 4 dias (≈ 96 h) e 8,9 dias ($\approx 213,6$ h) após a aplicação de E-17 β e BE, respectivamente. Nas ovelhas ovariectomizadas (Experimento 1) a concentração de FSH sofreu uma redução transitória e tornou a subir com 1,5 dias (≈ 36 h), e no grupo BE, a concentração plasmática de FSH alcançou concentrações constantes em 2,5 dias (≈ 60 h) (Figura 3) e não aumentou consideravelmente até 6 dias (≈ 144 h), mesmo em baixas concentrações de estradiol. Esse resultado explica o atraso na emergência da próxima onda folicular em ovelhas intactas que receberam 2 mg de BE em comparação às tratadas com 2 mg de E-17 β (Experimento 2). Em bovinos, a redução da dose de 5 mg para 1 mg de BE adiantou

a emergência da onda folicular e apresentou a mesma eficácia de sincronia que 5 mg de E-17 β (Martinez et al., 2005). Isso sugere que a dose de BE utilizada no presente experimento possa ser reduzida, no entanto, isso deve ser feito com cautela uma vez que 0,1 ou 0,2 mg de BE não suprimiu a onda folicular e nem recrutou uma nova onda durante a pré-estação reprodutiva de ovelhas (Takada et al., 2012).

As gonadotrofinas são criticamente importantes para o crescimento folicular (Mcneilly et al., 1992). O tipo de estradiol e o seu efeito sobre a secreção de FSH, no Experimento 2, não afetou a taxa de crescimento. Entretanto, o BE teve uma fase de crescimento menor, o que refletiu em um menor comprimento da onda e menor diâmetro do maior folículo da nova onda, do que no E-17 β . Por hipótese, alterações nas concentrações de estradiol possam ser reguladores significativos das concentrações de FSH em ovelhas, mesmo quando essas mudanças são pequenas ou não detectáveis, e/ou a pituitária pode ser altamente sensível a pequenas alterações nas concentrações de esteroides. Não se sabe ao certo o que levou o maior folículo da onda emergida no grupo BE não ter um crescimento semelhante ao E-17 β , contudo, a diferença no tempo de meia-vida e supressão de FSH entre os dois hormônios possam estar envolvidas.

Em resumo, a dose de estradiol e benzoato de estradiol utilizados neste estudo resultou na supressão das concentrações de FSH, e conseqüentemente, regressão e sincronia de uma nova onda folicular em ovelhas cíclicas. Este será um modelo útil para ser utilizado como base no desenvolvimento de novos protocolos de sincronização do estro que visem um melhor controle do desenvolvimento folicular.

7 CONCLUSÃO

A utilização de 2 mg de E-17 β ou 2mg de BE ou 2 mg de ECP ocasiona no aumento da concentração plasmática de E₂ em intervalos distintos, o que leva a uma supressão da concentração plasmática de FSH com a duração dependente do tempo de meia-vida da formulação de estradiol utilizada.

A dose de 2 mg de BE resulta na supressão prolongada da concentração de FSH, o que leva à um atraso na emergência da nova onda folicular em 4,9 dias em relação a utilização de E-17 β . Contudo, a associação da progesterona e 2 mg de E-17 β ou 2 mg de BE foram eficazes em suprimir e ressincronizar a emergência da onda folicular em ovelhas cíclicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 173-179, Feb 2012.
- ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.
- BAIRD, D. T. et al. Inhibin and estradiol in the control of fsh-secretion in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 125-138, 1991.
- BARRETT, D. M. W. et al. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, Apr 2008.
- BARRETT, D. M. W. et al. Differential effects of various estradiol-17beta treatments on follicle-stimulating hormone peaks, luteinizing hormone pulses, basal gonadotropin concentrations, and antral follicle and luteal development in cyclic ewes. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 252-262, Aug 2007.
- BARRETT, D. M. W. et al. Suppression of follicle wave emergence in cyclic ewes by supraphysiologic concentrations of estradiol-17beta and induction with a physiologic dose of exogenous ovine follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 4, p. 633-641, Oct 2006.
- BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 111-124, Jan 1999.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 229-245, Jul 2000.
- BARTLEWSKI, P. M. et al. Comparison of the effects of pretreatment with Veramix sponge (medroxyprogesterone acetate) or CIDR (natural progesterone) in combination with an injection of estradiol-17 beta on ovarian activity, endocrine profiles, and embryo yields in

cyclic ewes superovulated in the multiple-dose Folltropin-V (porcine FSH) regimen. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1225-1237, Oct 2015.

BISTER, J. L. et al. Control of ovarian follicles activity in the ewe. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, n. 2-3, p. 315-328, Oct 1999.

BO, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 3-4, p. 141-157, May 2000.

BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, Jan 1995.

BO, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17-beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, Jun 1994.

BO, G. A. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, Aug 1993.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, Sep 2003.

EVANS, A. C. O. et al. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 59-66, Jan 2002.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effect of oestrous synchronization with estradiol 17 beta and progesterone on follicular wave dynamics in dairy heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 6, p. 301-307, Dec 2001.

GIBBONS, J. R. et al. Follicular and fsh dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1005-1020, Oct 1999

JOHNSON, S. K. et al. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 69-79, Jan 1996.

MACMILLAN, K. L.; SEGWAGWE, B. V. E.; PINO, C. S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 327-344, Oct 2003.

MANN, G. E. et al. The role of inhibin and estradiol in the control of fsh-secretion in the sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 133, n. 3, p. 381-391, Jun 1992.

MAPLETOFT, R. J. et al. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14_suppl_2, p. E28-E36, 2003.

- MARTINEZ, M. F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, Mar 2005.
- MARTINEZ, M. F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-769, Sep 2000.
- MCNEILLY, A. S. et al. Luteinizing-hormone pulses, follicle-stimulating-hormone and control of follicle selection in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 5-19, 1992.
- MEIKLE, A. et al. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 beta. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 79-90, Jul 2001.
- MOREIRA, N. H. et al. Utilização de FSH:LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.
- O'ROURKE, M. et al. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1-2, p. 1-12, Apr 2000.
- ORIOWO, M. A. et al. A comparison of the pharmacokinetic properties of 3 estradiol esters. **Contraception**, v. 21, n. 4, p. 415-424, 1980.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014. Disponível em: < <http://www.R-project.org/> >. Acesso em: 02 de Fevereiro.
- RAWLINGS, N. C.; JEFFCOATE, I. A.; RIEGER, D. L. The influence of estradiol-17-beta and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing-hormone and follicle-stimulating-hormone in the ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 473-488, 1984.
- SA FILHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3-4, p. 132-139, Dec 2011.
- SILVA, B. D. M. et al. Ovulation induction in ewes using GnRH in long and short-term synchronization protocols. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 2, p. 312-315, Apr-Jun 2015.
- SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. **Journal of Endocrinology**, v. 156, n. 3, p. 563-572, Mar 1998.
- TAKADA, L. et al. Ovarian response of Suffolk ewes to estrous synchronization using short-term protocol. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 314-319, Feb 2012.

UNGERFELD, R. The induction of oestrus in ewes during the non-breeding season using pre-used CIDRs and oestradiol-17 beta treatment. **Small Ruminant Research**, v. 84, n. 1-3, p. 129-131, Jun 2009.

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. **Animal Science**, v. 68, p. 349-353, Apr 1999.

VINOLES, C. et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 993-1004, Mar 2001.

CAPÍTULO 5

EFEITO DO MOMENTO DA APLICAÇÃO E DA DOSE DE eCG SOBRE SINCRONIA DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM OVELHAS DESLANADAS SOB CONDIÇÕES TROPICAIS

1 RESUMO

A influência da dose (300UI ou 400UI) e do momento de aplicação (24 horas antes e no momento da remoção da progesterona) foi avaliada quanto ao desenvolvimento folicular e sincronia do estro e da ovulação em ovelhas deslanadas (n = 12), sincronizadas com progesterona por 12 dias e mantidas em 15° de latitude sul, sob condições tropicais. Todos os protocolos foram eficientes em induzir o estro, a ovulação e a formação de pelo menos um corpo lúteo funcional. A aplicação de 400 UI de eCG 24 horas antes da remoção do pessário de P4 aumentou a dispersão do momento do início da manifestação do estro e do momento da ocorrência da ovulação. O protocolo longo com progesterona associado a uma dose de 300 UI, independente do momento de aplicação, resulta em uma boa sincronia da ovulação, podendo ser utilizado em programas de IATF em ovinos deslanados.

Palavras chave: P4, ovino, sincronização do estro, fertilidade, inseminação artificial

2 ABSTRACT

Dose response of 300 IU or 400 IU and time application (24 hours before and at the time of progesterone removal) was evaluated to assess follicular development and synchronization of estrus and ovulation in hair sheep (n = 12), synchronized with progesterone for 12 days and maintained at 15° south latitude, under tropical conditions. All protocols were effective in estrus inducing, ovulation and the formation of at least one functional corpus luteum. The application of 400 IU eCG 24 hours before removing the pessary P4 increased the dispersion of the onset of estrus manifestation and the moment of the occurrence of ovulation. Long-term progesterone protocol associated with a dose of 300 IU, regardless of the time of application, results in a good synchronization of ovulation and can be used in FTAI programs in hair sheep.

Keywords: P4, sheep, estrous synchronization, fertility, artificial insemination

3 INTRODUÇÃO

A manipulação do ciclo estral em ovinos tem sido amplamente utilizada para induzir o estro durante a estação não reprodutiva, quando seu uso é obrigatório, e também para auxiliar na sincronização do estro e ovulação durante a estação reprodutiva, quando seu uso é opcional. O protocolo hormonal mais utilizado, baseia-se no tratamento longo com progestágeno ou progesterona associados à uma dose de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Souza, 2013). A dose de eCG pode variar de 250-500 UI, dependendo da idade, raça e estação (Abecia et al., 2012).

O eCG possui ação de FSH e LH e devido a sua longa meia-vida (eCG \approx 50 horas; Martinuk et al., 1991), apresenta um período prolongado de ação (Murphy, 2012). Usualmente a aplicação da eCG é realizada no momento da remoção da progesterona/progestágeno, entretanto, há relatos na literatura sobre a utilização da eCG em diferentes momentos, desde 48 horas antes até 24 horas depois da remoção do pessário (Ali, 2007; Koyuncu & Alticekic, 2010; Quintero-Elisea et al., 2011), o que pode influenciar na sincronia do estro e da ovulação.

O protocolo longo utilizando MAP e uma dose de 300 UI de eCG no momento da remoção da esponja, não resulta em boa sincronia o estro e a ovulação em ovelhas deslanadas (Moreira et al., 2014). Até o presente momento, em ovinos deslanados, as informações sobre a sincronia do estro e da ovulação com diferentes doses e momentos de aplicação de eCG são limitadas. Essa avaliação possibilitaria definir e contrastar a eficiência desses protocolos. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da dose e do tempo da aplicação de eCG sobre a sincronia do estro e ovulação, em ovelhas deslanadas, sincronizadas com progesterona e criadas em condições tropicais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo CEUA- Cenargen 261/2015).

4.1 Animais e delineamento experimental

O experimento foi realizado no final de novembro até a primeira quinzena de dezembro (terço final da primavera) no ano de 2015, em Brasília, DF, Brasil, localizado a 15°47' de latitude sul e 47°55' de longitude oeste, 1080m de altitude, de clima tropical. O clima da região é caracterizado por verão chuvoso e inverno seco, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013), com a precipitação mensal de 350 mm, temperatura média mensal de 20,5°C, umidade média mensal de 87,2%, no período estudado.

Foram utilizadas 39 ovelhas deslanadas da raça Santa Inês, híbridas e cíclicas, com idade entre 2 e 5 anos, peso médio de $49,2 \pm 6,2$ kg e escore de condição corporal entre 3,0 e 3,5 (escala de 1 a 5 [Thompson e Meyer, 1994]). Os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* e no período das avaliações do estro e ovulação, todos os animais foram alocados em baias coletivas recebendo feno de Tifton (*Cynodon sp.*). Em todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e sal mineral.

As ovelhas tiveram o estro sincronizado através da inserção de um dispositivo intravaginal contendo 0,33 g de progesterona (EAZI-BREED CIDR[®], Zoetis Indústria De Produtos Veterinários Ltda), que permaneceu por 12 dias. No momento da retirada do pessário

vaginal, as ovelhas foram divididas aleatoriamente ($n = 10$), para receber 300 UI ou 400 UI de eCG (Novormon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A.) por via intramuscular, 24 horas antes ou no momento da remoção da progesterona. O experimento seguiu um delineamento fatorial 2x2, formando assim quatro tratamentos: 300UI/-24h; 400UI/-24h; 300UI/0h; e 400UI/0h.

4.2 Avaliação do estro

Ao final do protocolo as ovelhas foram mantidas na presença de um rufião, que teve a região do externo pintado com uma mistura de óleo e tinta em pó. O estro foi avaliado em intervalos de quatro horas, por um período de 30 min, sendo consideradas em estro as fêmeas que aceitavam a monta e que estavam marcadas na região da garupa. Foram registrados os seguintes parâmetros: incidência de estro (%), obtido pela razão do número de ovelhas em estro pelo número total de ovelhas do tratamento; momento do início da manifestação do estro sendo o tempo entre a remoção do pessário até o início da manifestação estral; e dispersão do momento do início da manifestação do estro sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado do início da manifestação do estro em cada tratamento.

4.3 Avaliação ultrassonográfica

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas, em cada ovelha, doze horas após o início da manifestação do estro. Os exames ultrassonográficos foram realizados em intervalos de 6 horas usando scanner modo-B em tempo real, Mindray DP-2200Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical, Electronics CO, LTD, China), com transdutor linear multifrequencial adaptado para exame transretal. Todas as imagens foram obtidas na frequência de 7,5MHz.

Os seguintes parâmetros foram registrados: momento da ocorrência da ovulação sendo o tempo entre a remoção do pessário vaginal até a ovulação; dispersão do momento da ocorrência da ovulação sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado da ovulação em cada tratamento; diâmetro do maior folículo obtido pela média das duas maiores diagonais do folículo ovulatório, no momento da avaliação precedente a constatação da ovulação.

O momento da ocorrência da ovulação foi determinado como a média do tempo entre a última avaliação que o folículo ovulatório ($\geq 4\text{mm}$) estava presente e a avaliação em que se verificou o seu desaparecimento. Quando mais de um folículo ovulou em avaliações distintas foi considerado o momento da ovulação do primeiro folículo ovulado. Somente foram consideradas responsivas ao tratamento as ovelhas que manifestaram estro e ovularam no período de 118 horas após a retirada do pessário vaginal.

Sete dias após a ovulação foi realizado um novo exame ultrassonográfico para mensuração do diâmetro luteal, obtido pela média das duas maiores diagonais do CL. Os seguintes parâmetros foram registrados: número de corpos lúteos; volume total dos corpos lúteos, obtido pela fórmula matemática do volume do cilindro e o volume total obtido pela soma do volume de todos os corpos lúteos presentes nos dois ovários.

4.4 Dosagem hormonal

No dia da avaliação do CL, foram realizadas coletas de sangue para a mensuração da concentração sérica de progesterona. O sangue foi coletado por venopunção jugular, em tubos à vácuo sem anticoagulante, sendo posteriormente centrifugados. Logo após, o soro foi aspirado e estocado em microtubos de 2,0 mL e armazenado a -20°C até a análise. As concentrações séricas de progesterona (P4) foram mensuradas pela técnica de radioimunoensaio (RIA) de fase sólida, utilizando kits comerciais (Progesterone Coated Tube RIA Kit; MP Biomedicals, LLC Diagnostics Division, NY), seguindo as recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio foi de 9,86%.

4.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team 2013). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (D.P.) ou porcentagem, sendo considerados significativos quando $P \leq 0,05$ e como tendência quando $0,06 \leq P \leq 0,10$. Devido à instabilidade das variáveis estudadas, todas as variáveis foram submetidas a análises visuais para avaliar a homocedasticidade (boxplot) e a normalidade (hist, plot-density, qqnorm

e qqline), sendo comprovadas pelo teste de Bartlett (bartlett.test) e de Shapiro-Wilk (shapiro.test), respectivamente.

Devido ao comportamento da maioria dos dados não se adequar ao de uma distribuição normal, aderiu-se a utilização de modelos lineares generalizados (glm). A adequabilidade da distribuição utilizada em cada variável foi analisada através dos gráficos de envelopes simulados para os resíduos, utilizando-se a função de ligação em que os dados melhor se adequaram. Após o ajuste do modelo, foi utilizada uma análise de variância (anova) para interpretação quanto à significância dos resultados.

Somente a variável “volume total do CL” apresentou interação entre a dose e o momento de aplicação, e as diferenças foram analisadas por um teste de contraste t-test (contrast). As variáveis que não apresentaram interação entre a dose e o momento de aplicação, e que apresentaram uma influência separadamente da dose ou do momento de aplicação, foram agrupadas em cada categoria para análise. A incidência de estro foi avaliada pelo teste exato de Fisher (fisher.test). A dispersão do momento do início da manifestação do estro e do momento da ocorrência da ovulação foi analisada com o teste F na razão de variâncias (var.test) combinado com análise gráfica das distribuições de densidades (density). Análise de correlação de Spearman (cor.test) foi realizada para avaliar possíveis correlações entre o volume total dos CL e o tamanho do maior folículo, o número de ovulações, e as concentrações séricas de P4, durante a fase lútea após os protocolos de sincronização.

5 RESULTADOS

Os animais iniciaram a manifestação dos sinais clínicos de estro entre 22 e 71 h e ovularam entre 49 e 98 horas após a remoção da progesterona. Todas as ovelhas foram consideradas responsivas aos tratamentos devido à estas manifestarem estro e ovularem dentro de 118 horas após a remoção da progesterona. Não houve diferença na incidência de estro, momento do início da manifestação do estro e no momento da ocorrência da ovulação entre os quatro Grupos testados ($P > 0,05$; Tabela 1). A média global do intervalo estro/ovulação foi de $26,5 \pm 5,2$ horas ($P > 0,05$).

Tabela 1. Incidência de estro, momento do início da manifestação do estro (início do estro) e momento da ocorrência da ovulação (ovulação) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4

Tratamento	Incidência do estro (%)*	Início do estro (h)**	Ovulação (h)**
300UI/-24h	100 (10/10)	$30,6 \pm 6,3$	$61,9 \pm 9,4$
400UI/-24h	100 (9/9)	$30,5 \pm 17,6$	$54,9 \pm 18,7$
300UI/0h	100 (10/10)	$30,7 \pm 5,3$	$55,7 \pm 6,1$
400UI/0h	100 (10/10)	$34,3 \pm 7,6$	$59,3 \pm 10,6$

$P > 0,05$

*Ovelhas em estro/total

** Média \pm D.P.

A dispersão do momento do início da manifestação do estro foi de 60h, 25h, 25h e 20 horas nos Grupos 400UI/-24h, 400UI/0h, 300UI/0h e 300UI/-24h, respectivamente. O Grupo 400UI/-24h sincronizou menos o momento do início da manifestação de estro do que os outros grupos (Figura 1; $P < 0,05$).

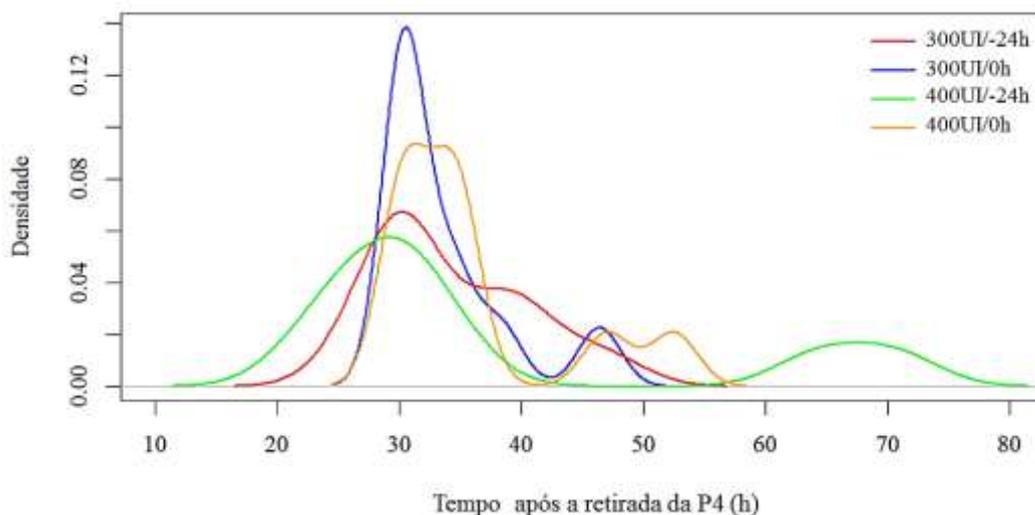


Figura 1. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4.

A dispersão do momento da ocorrência da ovulação foi de 60h, 40h, 25h e 25 horas nos Grupos 400UI/-24h, 400UI/0h, 300UI/0h e 300UI/-24h, respectivamente. O grupo 400UI/-24h concentrou menos o momento da ocorrência da ovulação em relação aos grupos 300UI/-24h e 300UI/0h (Figura 2; $P < 0,05$).

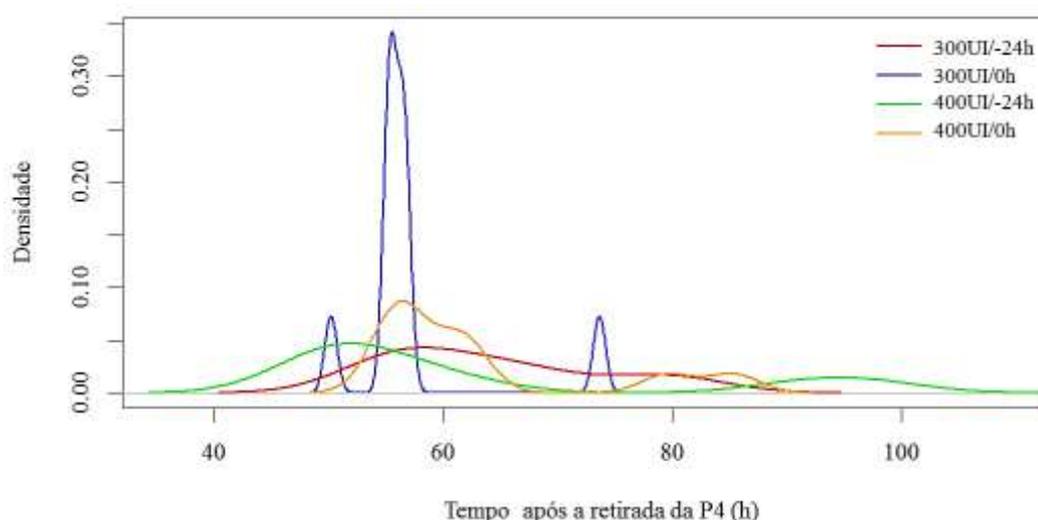


Figura 2. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4.

O diâmetro do maior folículo foi maior nos animais que receberam 400 UI de eCG ($P = 0,02$). Não houve diferença ($P > 0,05$) no número de corpos lúteos e na concentração de progesterona entre os grupos. O volume total dos corpos lúteos foi maior nos animais que receberam 400 UI de eCG ($P = 0,05$), assim como, foi maior no grupo 24h400UI em relação aos outros três grupos ($P = 0,03$) (Figura 3). O número de corpos lúteos foi positivamente correlacionado com o volume total dos CL ($r = 0,52$; $P < 0,001$) e com a concentração de progesterona ($r = 0,34$; $P < 0,05$).

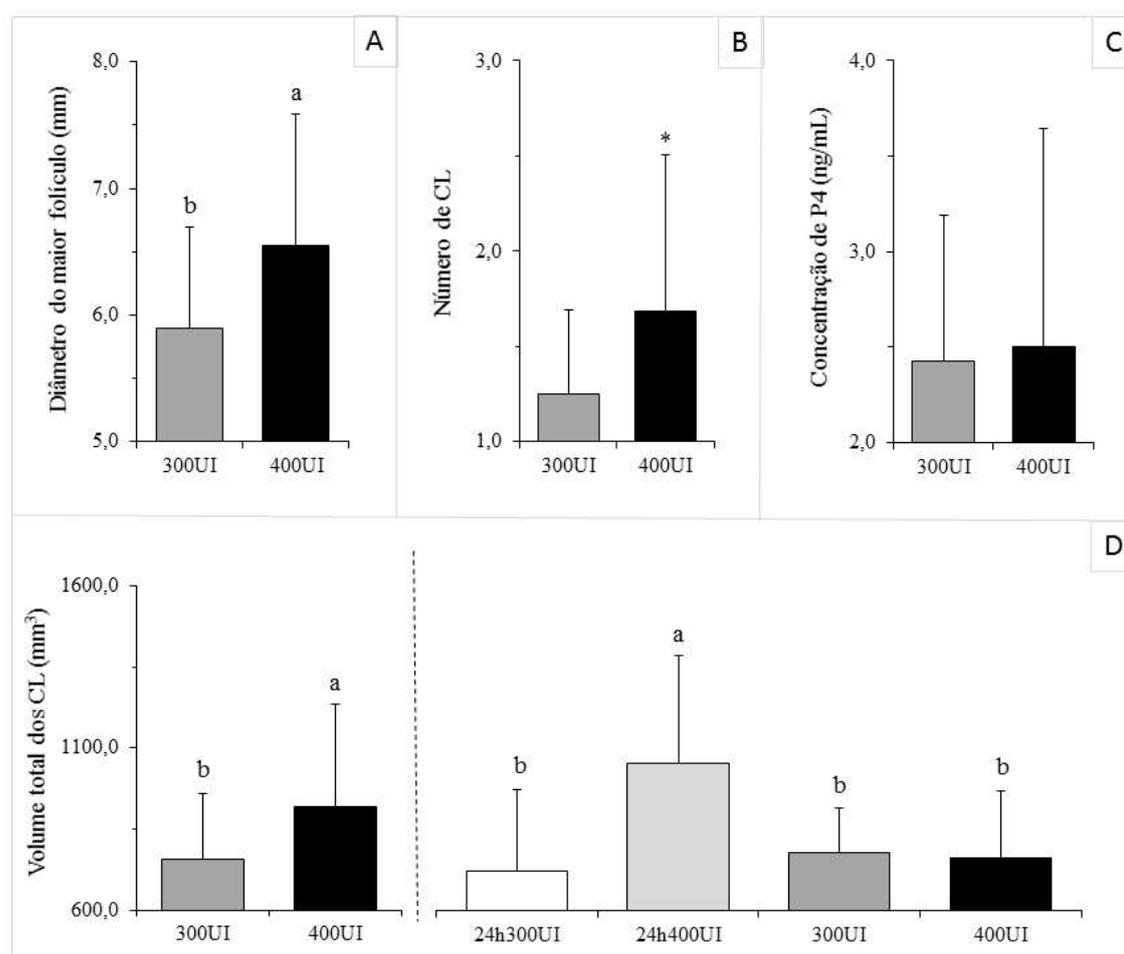


Figura 3. Média \pm D.P. do diâmetro do maior folículo (A), número de corpos lúteos (B), concentração de progesterona (C) e volume total dos CL (D), em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo longo de sincronização utilizando progesterona em combinação com 300UI ou 400UI de eCG, aplicados 24 horas ou no momento da remoção da P4 (^{a,b} $P < 0,05$; * $P = 0,07$).

6 DISCUSSÃO

O protocolo longo com progestágeno/progesterona é conhecido por induzir o estro em uma alta porcentagem de animais, independente da dose e do tempo de aplicação da eCG (Ali, 2007; Koyuncu & Alticekic, 2010; Hristova et al., 2011; Quintero-Elisea et al., 2011; Moakhar et al., 2012). Neste estudo 92% (36/39) das ovelhas manifestaram sinais de estro dentro de 48 h após a remoção da progesterona, enquanto 8% (3/39) manifestaram estro mais tarde (até 71 horas), semelhante ao verificado por outros autores (Quintero-Elisea et al., 2011; Oliveira et al., 2016). A indução do estro é indispensável para reverter os efeitos provocados pela influência do fotoperíodo em regiões de clima temperado. Entretanto, em regiões de clima tropical, em que os animais sofrem pouca ou nenhuma influência do fotoperíodo (Rosa e Bryant, 2003; Balaro et al., 2014), a sincronia do estro é feita principalmente em associação com a IA utilizando sêmen congelado, portanto é indispensável uma previsão acurada da ovulação, além de uma boa sincronia.

O momento em que a ovulação ocorre pode sofrer influência da raça, do tipo de hormônio utilizado e da época em que é realizado o protocolo hormonal, o que também explicaria em parte, as variadas taxas de fertilidade (revisado por [Salamon e Maxwell, 1995]). Neste estudo o momento do início da manifestação do estro e o momento da ocorrência da ovulação não se alteraram em função da dose e do momento da aplicação da eCG, tendo uma média global, em 92% dos animais, de $33,0 \pm 5,6$ e $59,2 \pm 8,1$ horas, respectivamente. O momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação são parâmetros importantes para a determinação do horário da inseminação, o que evita a realização de inseminações muito cedo ou muito tarde em relação ao momento da ovulação. As recomendações observadas na literatura para o momento em que a IA deve ser realizada são amplas, entre 48 a 64 horas (revisado por [Salamon e Maxwell, 1995]) e entre 60 a 65 horas (revisado por [Amiridis e Cseh, 2012]), e como a viabilidade do espermatozoide do sêmen

congelado é curta (Bailey et al., 2003), e a inseminação tardia tem sido associada com a fertilização de ovócitos anormais ou com a falha na clivagem de oócitos fertilizados (revisado por [Salamon e Maxwell, 1995]) é importante ter o controle preciso do tempo da ovulação com uma boa sincronia, para realizar a IA o mais próximo da ovulação em um maior número de animais.

A dose e o tempo em que o eCG é aplicado durante o protocolo longo podem influenciar na sincronia do estro (Quintero-Elisea et al., 2011), e essa resposta provavelmente alteraria a sincronia da ovulação e subsequente fertilidade em programas de IATF. No presente estudo, a utilização de 400 UI de eCG 24 horas antes da remoção da progesterona resultou em uma ampla variação (60 horas) no momento do estro e no momento da ovulação. Isso ocorreu devido à alguns animais apresentarem estro (33%; 3/9) e ovulações (44%; 4/9) precoces. A utilização da eCG antes da remoção do pessário de progestágeno também antecipou o estro em outros trabalhos (Ali, 2007; Quintero-Elisea et al., 2011). Contudo, no grupo 300UI/-24h o estro somente foi antecipado em um animal (10%; 1/10), o que não interferiu na sincronia da ovulação. Tanto o grupo 300UI/-24h quanto o grupo 300UI/0h apresentaram uma variação pequena nas ovulações (25 horas), apesar disso, foi interessante notar que 90% dos animais do grupo 300UI/0h apresentaram um alto padrão de sincronia das ovulações entre 50,2 e 56,7 horas (média $55,4 \pm 2,0$ horas), enquanto que somente 60% dos animais do grupo 300UI/-24h apresentaram o mesmo padrão entre 55,4 e 62,0 horas (média $57,9 \pm 3,2$ horas). Em outro trabalho com condições similares, o protocolo longo com acetato de medroxiprogesterona (MAP) não sincronizou a ovulação de igual forma, em ovelhas deslanadas (Moreira et al., 2014), sugerindo que diferentes fontes de progesterona possam estar envolvidas na sincronia da resposta aos protocolos hormonais.

Independente do protocolo usado, foi observado que 57,1% (4/7) dos animais que ovularam tardiamente (entre 73 a 98 horas) possuíam um corpo lúteo visível no início do exame ultrassonográfico. O diâmetro máximo de CL é atingido 6-9 dias após a ovulação e, em seguida, se inicia a regressão entre os dias 13 e 16 em ovelhas (revisado por [Sangha et al., 2002]; Figueira et al., 2015). Portanto, é possível que algum destes animais, ainda apresentavam um corpo lúteo funcional após a remoção da progesterona, consequentemente, atrapalhado a sincronia das ovulações. A presença de um maior número de animais nessa condição no grupo 400UI/-24h também pode ter contribuído para a menor sincronia alcançada por esse protocolo. Diante dessa observação, a adição da prostaglandina um dia antes da remoção da progesterona poderia ser uma estratégia útil para evitar a ocorrência de ovulações tardias.

Um dos principais efeitos da eCG é o aumento na taxa de ovulação de maneira dose-dependente (Moakhar et al., 2012). No presente estudo, o aumento da dose de eCG tendeu a aumentar o número de CL ($P = 0,07$). O número de CL formados após as ovulações foi positivamente correlacionado com o volume total dos CL ($r = 0,52$; $P < 0,001$) e com a concentração de progesterona ($r = 0,34$; $P < 0,05$). Contudo o aumento no número de CL influenciou somente no volume total dos CL, não aumentando a produção de progesterona. Também foi observado que a influência da dose de eCG no aumento no volume total do CL ocorreu somente no grupo 400UI/-24h. É possível que a formação dos corpos lúteos, durante os protocolos de sincronização, sofra alterações de maneira dose-dependente quando o eCG é aplicado antes da remoção da progesterona.

Interessantemente não houve correlação entre o volume total do CL com a concentração de progesterona ($r = 0,24$; $P = 0,16$), como foi observado por outro autor (Oliveira et al., 2016). Entretanto, Fuerst et al. (2009) observaram que o aumento no número de estruturas luteais presentes no ovário não foram correlacionadas com a concentração de progesterona após tratamento superovulatório. Sabe-se que o corpo lúteo é composto por vários tipos celulares que lhe fornecem sustentação e suporte esteroidogênico, e esse suporte depende da quantidade e capacidade do tecido esteroidogênico em sintetizar progesterona, bem como de um bom fluxo sanguíneo (Niswender et al., 2000; Sangha et al., 2002). Portanto, é possível que o aumento da dose de eCG altere a quantidade e/ou tamanho das células que compõe o CL sem alterar a produção de P4. Embora o efeito da dose de eCG sobre o volume total do CL não tenha se estendido sobre a concentração de progesterona, todos os protocolos promoveram a formação de pelo menos um corpo lúteo funcional com produção esteroidogênica suficiente para a manutenção da gestação em quase todos os animais.

Corpos lúteos subnormais podem ser categorizados em dois grupos. O primeiro grupo inclui o corpo lúteo que possui uma vida útil curta. O segundo grupo inclui corpo lúteo que tem uma vida útil normal, mas com secreção de progesterona reduzida (revisado por [Garverick et al., 1992]). Neste estudo, 10% (4/40) dos animais apresentaram concentrações circulantes de progesterona (< 1 ng/mL) abaixo do que é observado em corpos lúteos durante o meio da fase luteal (Bartlewski et al., 1999; Oliveira et al., 2016). Um destes animais, ovulou 3 folículos, mas na avaliação do CL somente foi observado um CL com volume e ecogenicidade anormal, sugestivo de regressão prematura de corpo lúteo. Nos outros 3 animais, a secreção de progesterona foi reduzida sem a regressão morfológica do CL. O motivo porque isso aconteceu é difícil de explicar, contudo, Oliveira et al. (2016), em 21° de latitude, observaram uma maior incidência de corpos lúteos subnormais (31,4%) no período do verão (dezembro a fevereiro),

sugerindo um efeito da época do ano sobre a funcionalidade do CL. Isso nos faz pensar que em 15° de latitude, no período estudado (final da primavera), isso também possa ocorrer.

No geral, os protocolos utilizados foram eficientes em induzir o estro, a ovulação e a formação de um corpo lúteo funcional em quase todas as ovelhas. Entretanto, alguns fatores, não inerentes ao protocolo testado (diferentes doses e momentos de aplicação do eCG), que poderiam afetar as taxas de fertilidade em um programa de IATF foram observados, como: a presença de um corpo lúteo ao final do protocolo com 12 dias de progesterona, o que provavelmente afetou a sincronia da ovulação; e a presença de corpos lúteos subnormais que afetam diretamente a manutenção da gestação. No primeiro caso, a adição de uma dose de prostaglandina um dia antes da remoção da progesterona provavelmente resolveria o problema. No segundo, apesar da anormalidade da função lútea ser de grande preocupação, devido a sua alta ocorrência, principalmente após protocolos de superovulação (revisado por [Cognie et al., 2003; Brasil et al., 2014; Rodriguez et al., 2015]), mais estudos são necessários para elucidar as possíveis causas e formas de controle dessa alteração. Portanto, sugere-se a utilização do protocolo com progesterona natural combinado com uma aplicação de 300 UI de eCG, no momento da remoção da progesterona, pois essa abordagem além de permitir uma redução no manejo, resulta em uma alta sincronia da ovulação (6,5 horas) em 90% dos animais. Diante dessa nova realidade, novos trabalhos devem ser conduzidos, para avaliar diferentes métodos e diferentes tempos de IA em programas de IATF, a fim de controlar cada vez mais os fatores que afetam as taxas de fertilidade em ovelhas deslanadas sob condições tropicais.

7 CONCLUSÃO

Em condições tropicais, na época de transição seca/chuvosa, a utilização de 300 UI no momento ou 24 horas antes da remoção do pessário de progesterona natural, na sincronização de ovelhas deslanadas, reduz a dispersão do momento do início da manifestação do estro e do momento da ocorrência da ovulação em relação a aplicação de 400 UI, 24 horas antes da remoção da P4, resultando em uma boa sincronia em uma alta porcentagem de animais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 173-179, Feb 2012.

ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, n. 1, p. 33-37, Sep 2007.

ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013. ISSN 0941-2948.

AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 152-161, Feb 2012.

BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 393-401, Sep 2003.

BALARO, M. F. A. et al. Is the Santa Ines sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 8, p. 1533-1537, Dec 2014.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1-2, p. 51-66, Oct 1999.

BRASIL, O. O.; MOREIRA, N. H.; RAMOS, A. F. Situação atual da superovulação em ovinos. **Revista Brasileira de reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 147-153, 2014.

COGNIE, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 171-188, Jan 2003.

FIGUEIRA, L. M. et al. Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Ines Ewes, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 643-650, 2015.

FUERST, K. J.; BARTLEWSKI, P. M.; KING, W. A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v. 82, n. 2-3, p. 144-148, Apr 2009.

GARVERICK, H. A.; ZOLLERS, W. G.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with corpus-luteum life-span in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1-4, p. 111-124, Jul 1992.

HRISTOVA, T. et al. The influence of the time of implementation of pmsg on some of the reproductive parameters in sheep with synchronized oestrus. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 4, p. 1845-1850, 2011.

KOYUNCU, M.; ALTICEKIC, S. O. Effects of Progestagen and PMSG on Estrous Synchronization and Fertility in Kivircik Ewes during Natural Breeding Season. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 3, p. 308-311, Mar 2010.

MARTINUK, S. D. et al. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological-activity of equine chorionic-gonadotropin *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 598-604, Oct 1991.

MOAKHAR, H. K. et al. Ovarian response and pregnancy rate following different doses of eCG treatment in Chall ewes. **Small Ruminant Research**, v. 102, n. 1, p. 63-67, Jan 2012.

MOREIRA, N. H. et al. Utilização de FSH:LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, Jul-Sep 2012.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, Jan 2000.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in Santa Ines ewes under subtropical conditions. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 452-460, Feb 2016.

QUINTERO-ELISEA, J. A. et al. The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 8, p. 1567-1573, Dec 2011.

RODRIGUEZ, M. G. K. et al. Regressão luteal prematura em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 270-276, 2015.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 3, p. 155-171, Jun 2003.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen .2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1-2, p. 1-36, Mar 1995.

SANGHA, G. K.; SHARMA, R. K.; GURAYA, S. S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 1, p. 53-64, Jan 2002.

SOUZA, M. I. L. Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 220-225, 2013.

THOMPSON, J.; MEYER, H. **Body condition scoring of sheep**. UNIVERSITY, O. S. Corvallis: OSU Extension Catalog 1994.

CAPÍTULO 6

**SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO EM OVINOS: O USO DA PROGESTERONA
PERMITE UMA ELEVADA SINCRONIA DA OVULAÇÃO E AUMENTA A TAXA
DE FERTILIDADE COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA**

1 RESUMO

O tipo de progestágeno/progesterona pode influenciar consideravelmente nos protocolos de sincronização do estro. O efeito do protocolo curto por 6 dias com progesterona ou acetato de medroxiprogesterona foi avaliado quanto a sincronia do estro e da ovulação em ovelhas deslanadas (n = 12). O protocolo curto com P4 resultou em alta sincronia da ovulação. Esse protocolo foi posteriormente utilizado para avaliar as taxas de fertilidade, em ovelhas inseminadas por via cervical superficial em diferentes momentos com sêmen congelado, porém, esse método de IA resultou em taxas de gestação próximas a 20%, independente do horário de realização da IA. Após a utilização do protocolo curto com progesterona, a inseminação artificial por via laparoscópica talvez seja necessária para a obtenção de uma taxa de fertilidade próxima de 70% após a sincronização do estro e IATF com sêmen congelado.

Palavras chave: MAP, P4, protocolo curto, inseminação cervical superficial, sêmen congelado

2 ABSTRACT

The type of progestogen/progesterone can influence considerably in estrus synchronization protocols. The effect of short protocol for 6 days with progesterone or medroxyprogesterone acetate was evaluated as the timing of estrus and ovulation in hair sheep (n = 12). The short protocol with P4 resulted in high synchrony of ovulation. This protocol was later used to evaluate fertility rates in ewes inseminated by a superficial cervical route at different times with frozen semen, however, this IA method resulted in fertility rates close to 20% independent of the realization of IA time. After using the short protocol with progesterone, laparoscopic artificial insemination may be necessary to achieve a fertility rate close to 70% after estrus synchronization and FTAI with frozen semen.

Keywords: MAP, P4, short protocol, superficial cervical insemination, frozen semen

3 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma poderosa ferramenta para os programas de melhoramento genético e conservação de raças ovinas. No entanto, essa biotécnica é menos difundida em ovinos do que nas outras espécies domésticas. Isso ocorre pela maior dificuldade no uso do sêmen congelado e pelos resultados irregulares e baixos de fertilidade nos programas de sincronização do estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (Anel et al., 2006; Allaoui et al., 2014).

Os protocolos convencionais consistem na exposição à progesterona/progestágeno por 12-14 dias (Abecia et al., 2012). No entanto, esses protocolos não conseguem manter altas concentrações de progesterona durante todo o tratamento (Vinoles et al., 1999; Oliveira et al., 2016). Isso pode alterar o transporte e sobrevivência espermática, e pode estender o tempo de vida do folículo ovulatório, causando um envelhecimento oocitário (Santolaria et al., 2011). A fim de evitar esse efeito, os protocolos com a exposição à progesterona por um curto período de tempo (5-7 dias) foram desenvolvidos como uma alternativa econômica e mais flexível para condições de campo (Vinoles et al., 2001; Ungerfeld & Rubianes, 2002). Contudo, não se sabe qual o efeito da utilização de diferentes fontes de progesterona/progestágenos sobre a dispersão do estro e da ovulação em protocolos curtos.

O protocolo longo com acetato de medroxiprogesterona (MAP) não sincroniza o estro e a ovulação de forma eficiente (Moreira et al., 2014), em contrapartida, o tratamento longo com P4 resulta em uma boa sincronia da ovulação (dados não publicados). Além disso, melhores taxas de fertilidade foram conseguidas utilizando a P4 em relação aos progestágenos na inseminação artificial por laparoscopia (IAL) em tempo fixo, com a utilização do protocolo longo (Swelum et al., 2015) e curto (Santos-Neto et al., 2015). Esses resultados sugerem que parte da inconsistência dos resultados de fertilidades nos programas de IATF pode estar relacionada à fonte de progesterona/progestágeno empregada nos tratamentos hormonais.

A melhor sincronia das ovulações e o uso de uma técnica de IA simples e acessível aos criadores, são indispensáveis para a difusão da IA em ovinos. A técnica de inseminação por via cervical superficial (IAC) atende esses pré-requisitos. Apesar disso, os resultados com a IAC utilizando sêmen congelado usualmente são baixos (Salamon & Maxwell, 1995). Isso pode estar relacionado à baixa sincronia da ovulação com os protocolos empregados e/ou inseminação em horário inadequado. Até o presente momento, não se sabe se uma alta sincronia da ovulação poderia aumentar as taxas de fertilidade com sêmen congelado na IAC, viabilizando o uso dessa técnica.

Nesse sentido, três experimentos foram realizados com os objetivos de avaliar: 1) a sincronia do estro e ovulação utilizando o protocolo curto com P4 e MAP; 2) o melhor momento (8 ou 4h antes da média da ovulação determinado no Experimento 1) para a realização da inseminação artificial por via cervical superficial com sêmen congelado; 3) o efeito da deposição seminal por via cervical superficial ou intrauterina sobre as taxas de fertilidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Preocupações éticas foram atendidas em conformidade com o regulamento local de práticas de bem-estar animal. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo CEUA- Cenargen 309/2016).

4.1 Animais e delineamento experimental

Os experimentos foram realizados no terço final de março até segunda quinzena de setembro (início do outono até o final do inverno) de 2016. Todos os experimentos foram realizados em Brasília, DF, Brasil, localizado a 15°47' de latitude sul e 47°55' de longitude oeste, 1080m de altitude, de clima tropical. O clima da região é caracterizado por verão chuvoso e inverno seco, tipo AW pela classificação de Köppen (Alvares et al., 2013).

Foram utilizadas ovelhas deslanadas da raça Santa Inês, híbridas, com idade entre 2 e 5 anos, peso médio de $46,4 \pm 4,9$ kg e escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (escala de 1 a 5 [Thompson e Meyer, 1994]). Os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* e somente no período das avaliações do estro e ovulação, todos os animais foram alocados em baias coletivas recebendo feno de Tifton (*Cynodon sp.*). Em todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e sal mineral.

4.2 Experimento 1

Vinte e quatro fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos (n = 12): protocolo curto com 0,33 g de progesterona (EAZI-BREED CIDR[®], Zoetis Indústria De Produtos Veterinários Ltda) e protocolo curto com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Progespon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A.). O dispositivo de progesterona/progestágeno permaneceu inserido na vagina das ovelhas durante 6 dias. Todas as fêmeas receberam uma dose de 250 µg de cloprostenol sódico (Clocio[®], Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A.) um dia antes da remoção do pessário e 300 UI de eCG (Novormon[®], Intervet Schering-Plough do Brasil S.A.) no dia da remoção do pessário de progesterona/progestágeno.

Ao final do protocolo as ovelhas foram mantidas na presença de um rufião criptorquida, que teve a região do externo pintado com uma mistura de óleo e tinta em pó. O estro foi avaliado em intervalos de quatro horas, por um período de 30 min, sendo consideradas em estro as fêmeas que aceitavam a monta e que estavam marcadas na região da garupa. Foram registrados os seguintes parâmetros: incidência de estro (%), obtido pela razão do número de ovelhas em estro pelo número total de ovelhas do tratamento; momento do início da manifestação do estro sendo o tempo entre a remoção do pessário até o início da manifestação estral; e dispersão do momento do início da manifestação do estro sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado do início da manifestação do estro em cada tratamento.

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas, em cada ovelha, doze horas após o início da manifestação do estro. Os exames ultrassonográficos foram realizados em intervalos de 8 horas usando scanner modo-B em tempo real, Mindray DP-2200Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical, Electronics CO, LTD, China), com transdutor linear multifrequencial adaptado para exame transretal. Todas as imagens foram obtidas na frequência de 7,5MHz.

Os seguintes parâmetros foram registrados: momento da ocorrência da ovulação sendo o tempo entre a remoção do pessário vaginal até a ovulação; dispersão do momento da ocorrência da ovulação sendo a diferença entre o maior e menor tempo observado da ovulação em cada tratamento; diâmetro do maior folículo obtido pela média das duas maiores diagonais do folículo ovulatório, no momento da avaliação precedente à constatação da ovulação.

O momento da ovulação foi determinado como a média do tempo entre a última avaliação que o folículo ovulatório ($\geq 4\text{mm}$) estava presente e a avaliação em que se verificou o seu desaparecimento. Quando mais de um folículo ovulou em avaliações distintas foi

considerado o momento da ovulação do primeiro folículo ovulado. Somente foram consideradas responsivas ao tratamento as ovelhas que manifestaram estro e ovularam no período de 118 horas após a retirada do pessário vaginal.

Sete dias após a ovulação foi realizado um novo exame ultrassonográfico para mensuração do diâmetro luteal (média das duas maiores diagonais do CL). Os seguintes parâmetros foram registrados: número de corpos lúteos; volume total dos corpos lúteos, obtido pela fórmula matemática do volume do cilindro e o volume total obtido pela soma do volume de todos os corpos lúteos presentes nos dois ovários.

4.3 Experimento 2

Cinquenta e seis fêmeas foram submetidas ao protocolo (Experimento 1) utilizando progesterona e foram divididas aleatoriamente para ser inseminadas em dois momentos diferentes ($n = 28$), com sêmen congelado, por via cervical superficial (IAC). A IAC foi realizada as 50 e as 54 h após a retirada da P4, correspondendo a 8 e 4 horas antes da média da ovulação observada no Experimento 1 (≈ 58 h). Durante a IAC as ovelhas foram contidas com os membros posteriores levantados, e o cérvix foi localizado usando um espéculo vaginal equipado com uma fonte de luz. O sêmen foi depositado, na medida do possível, o mais profundo dentro do canal cervical, mas sem uso de força.

O sêmen utilizado para a inseminação artificial foi obtido do segundo ejaculado de três carneiros que apresentaram concentração $\geq 3 \times 10^9$ /mL, motilidade massal ≥ 3 , motilidade espermática $\geq 80\%$, vigor ≥ 3 e patologia espermática $\leq 20\%$ (CBRA, 2013). Os ejaculados foram agrupados em banho maria a 33°C e imediatamente diluído em *one-step*, com TRIS-gema-glicerol (Triladyl[®], Minitüb do Brasil Ltda), até atingir uma concentração final de 600×10^6 /mL de espermatozoides. O sêmen diluído foi armazenado em palhetas francesas de 0,25 mL e resfriado de 33°C até 5°C em um período de 1,5 hora, e depois mantido por mais 1 hora nesta temperatura. Após este período de equilíbrio, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido (-80°C) por 15 min a 3,5 cm do nível de nitrogênio líquido e, então, submersas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijões criogênicos (-196°C) até o dia da inseminação.

O diagnóstico de gestação foi realizado em todos animais, 27 dias após o dia da IA, por ultrassonografia usando scanner modo-B em tempo real, Mindray DP-2200Vet

(Shenzhen Mindray Bio-Medical, Electronics CO, LTD, China), com transdutor linear multifrequencial, com frequência de 7,5MHz, adaptado para exame transretal. A taxa de fertilidade foi definida como o total de animais prenhes no exame ultrassonográfico dividido pelo total de animais inseminados e expressa em porcentagem de animais prenhes (%).

4.4 Experimento 3

Oitenta fêmeas foram submetidas ao protocolo com progesterona (Experimento 1) e divididas aleatoriamente em dois grupos ($n = 40$) para ser inseminadas por dois métodos de inseminação diferentes, com sêmen congelado. A IA foi realizada às 54 h após a remoção da P4, por via cervical superficial (IAC) ou laparoscópica (IAL), correspondendo a 4 horas antes da média da ovulação observada no Experimento 1 (≈ 58 h). As IACs foram realizadas utilizando a mesma metodologia do Experimento 2 e as IALs foram realizadas de acordo com o descrito por Maxwell & Butler (1984). Previamente, as 40 ovelhas do grupo IAL, foram submetidas a um jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 horas, respectivamente. No momento da inseminação as fêmeas foram colocadas em uma maca cirúrgica apropriada, em posição de Trendelenburg. No campo cirúrgico, região abdominal cranial ao úbere, foi realizado tricotomia e antissepsia com tintura de iodo a 2% e álcool 70%, e em seguida feito anestesia local infiltrativa na dose de 0,04 mg de cloridrato de lidocaína (Lidovet™, Bravet, Brasil) por botão anestésico, no local em que foram introduzidos os trocartes. O sêmen foi depositado na porção médio-distal de cada corno uterino, utilizando metade da dose inseminante em cada corno. A preparação do sêmen utilizado na inseminação artificial e o diagnóstico de gestação foram realizados conforme descrito no Experimento 2.

4.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team, 2014). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (D.P.) ou porcentagem, sendo considerados significativos quando $P \leq 0,05$ e como tendência quando $0,06 \leq P \leq 0,10$. Devido à instabilidade das variáveis estudadas, todas as variáveis foram submetidas a

análises visuais para avaliar a homocedasticidade (boxplot) e a normalidade (hist, plot-density, qqnorm e qqline), sendo comprovadas pelo teste de Bartlett (bartlett.test) e de Shapiro-Wilk (shapiro.test), respectivamente.

Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste t de Student (t.test), enquanto os não paramétricos foram avaliados pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon (wilcox.test). A incidência de estro e a fertilidade do Experimento 2 foram avaliadas pelo teste exato de Fisher (fisher.test) e a fertilidade do Experimento 3 foi avaliada pelo teste de Qui-Quadrado (chisq.test). A dispersão do momento do estro e da ovulação foi analisada com o teste F na razão de variâncias (var.test) combinado com análise gráfica das distribuições de densidades (density). Análise de correlação de Spearman (cor.test) foi realizada para avaliar possíveis correlações entre o volume total dos CL e o tamanho do maior folículo e o número de ovulações, durante a fase lútea após os protocolos de sincronização.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

Os animais iniciaram a manifestação dos sinais clínicos de estro entre 20,5 h e 35,4 h quando utilizado o protocolo com P4 e entre 20,5 h e 65,7 h com MAP. A ovulação ocorreu entre 52,2 h e 61,2 h após a retirada da P4 e entre 44,0 h e 108,0 h após a retirada do MAP. Somente uma ovelha do grupo MAP foi considerada como não responsiva aos tratamentos devido à esta não manifestar estro e ovular dentro de 118 horas após a remoção do pessário. O grupo P4 antecipou o momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação em relação ao MAP ($P < 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Incidência de estro, momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com eCG

Variável	Tratamento	
	P4	MAP
Incidência de Estro (%)	100 (12/12)	91,7 (11/12)
Momento do início da manifestação do estro (h)*	27,7±5,8 ^a	43,1±14,6 ^b
Momento da ocorrência da ovulação (h)*	57,9 ± 3,9 ^a	80,0 ± 21,2 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$)

* Média ± D.P

A dispersão do momento do início do estro foi de 14,9 h e 45,2 h nos grupos P4 e MAP, respectivamente. O grupo P4 concentrou mais o momento do início da manifestação de estro do que o MAP (Figura 1; $P < 0,05$). A dispersão do momento da ocorrência da ovulação

foi de 8,9 h e 63,9 h nos grupos P4 e MAP, respectivamente. O grupo P4 concentrou mais o momento da ocorrência da ovulação em relação ao MAP (Figura 2; $P < 0,05$).

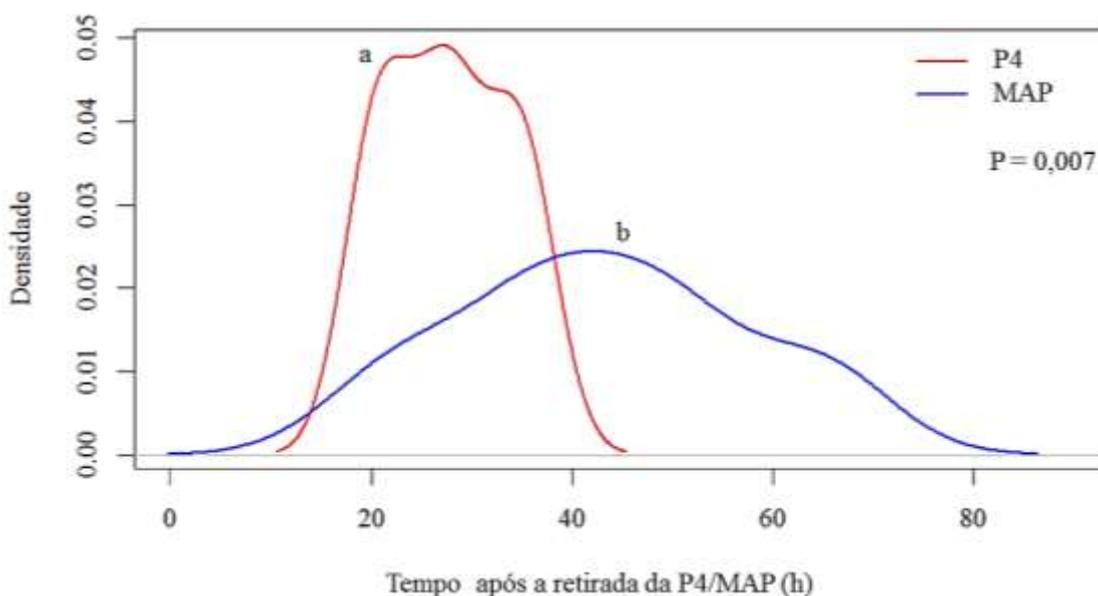


Figura 1. Comportamento da função densidade de probabilidade para o momento do início da manifestação do estro (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com 300UI.

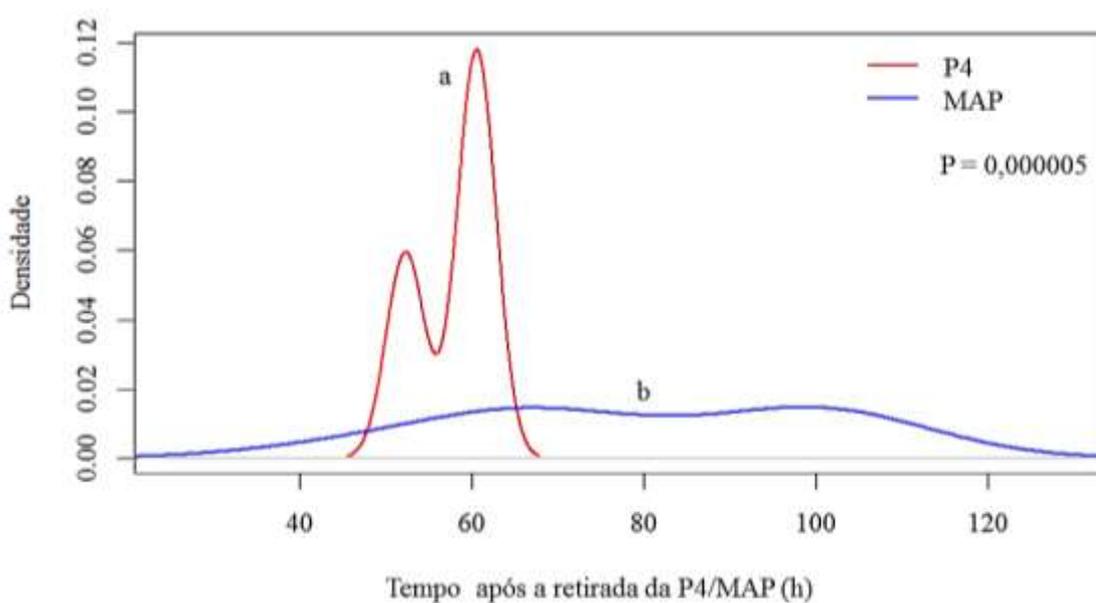


Figura 2. Comportamento da função densidade de probabilidade para momento da ocorrência da ovulação (teste F na razão de variâncias) em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com 300UI.

Não houve diferença ($P > 0,05$) no diâmetro do maior folículo, no número de corpos lúteos e no volume total dos CL (Tabela 2). O número de corpos lúteos foi positivamente correlacionado com o volume total dos CL ($r = 0,66$; $P = 0,001$). Dois animais (16,7%; 2/12) do grupo P4 apresentaram regressão prematura do CL, devido à estes animais não possuírem pelo menos um CL no sétimo dia após a ovulação.

Tabela 2. Média \pm D.P. do diâmetro do maior folículo, número de CL e volume total dos CL em ovelhas deslanadas submetidas a protocolo curto de sincronização utilizando P4 ou MAP em combinação com eCG

Variável	Tratamento	
	P4	MAP
Diâmetro do > folículo (mm)	5,7 \pm 0,9	6,2 \pm 0,7
Número de CL	1,8 \pm 0,7	1,7 \pm 0,6
Volume total dos CL (mm ³)	1038,0 \pm 287,0	950,2 \pm 340,2

$P > 0,05$

5.2 Experimentos 2 e 3

A taxa de fertilidade foi significativamente influenciada pelo método utilizado na inseminação artificial, apresentando 12,5% (5/40) para a IAC *versus* 74,4% (29/39) para a IAL ($P < 0,0001$), enquanto não houve diferença significativa entre os momentos de inseminação artificial entre os grupos na IAC, apresentando 14,3% (4/28) para 50 h *versus* 22,2% (6/27) para 54 h ($P > 0,05$), tendo uma taxa global de 20% (11/55) de fertilidade no Experimento 2 (Figura 3).

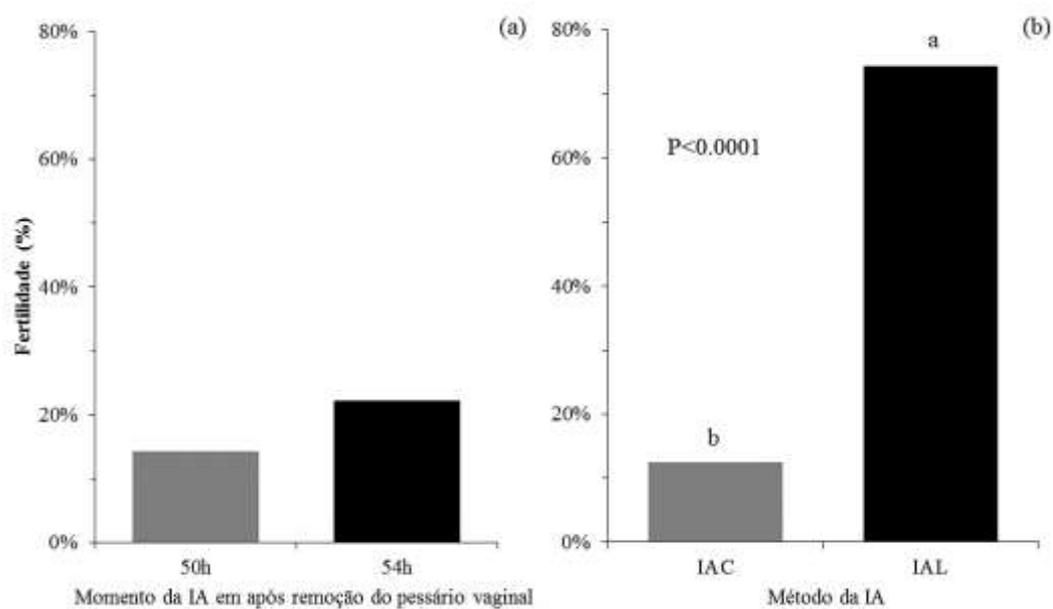


Figura 3. Taxa de fertilidade em ovelhas deslanadas com estro sincronizado por protocolo de curta duração com emprego de P4 (a; Experimento 2; $P > 0,05$) em combinação com 250 μg de cloprostenol sódico e 300 UI de eCG, utilizando dois métodos de inseminação, cervical superficial ou laparoscópica (b; Experimento 3; $a,b P < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

O Experimento 1 foi realizado a fim de se obter a resposta fisiológica das ovelhas quanto a sincronia do estro e ovulação utilizando o protocolo curto com P4 e MAP. Como o protocolo com P4 apresentou melhor sincronia da ovulação, hipotetizou-se que esse protocolo associado à IAC realizada 8 horas antes da média da ovulação resultaria em elevada taxa de fertilidade, uma vez que, o sêmen permaneceria viável durante o intervalo entre a primeira e a última ovulação. Por essa razão foi realizado o Experimento 2 para avaliar o melhor momento (8 ou 4 h antes da média da ovulação) para a realização da inseminação artificial por via cervical superficial. Com as baixas taxas de fertilidade alcançadas hipotetizou-se que o sêmen congelado permanece viável, porém apresenta dificuldade em ultrapassar a barreira cervical. Na tentativa de obter melhor fertilidade, o Experimento 3 foi realizado para avaliar o efeito da deposição cervical superficial ou intrauterina sobre as taxas de gestação.

O tipo de progesterona/progestágeno em um tratamento curto de 6 dias seguida da aplicação de 300UI de eCG imediatamente após a remoção do pessário (Experimento 1), alterou o padrão de sincronia do estro e ovulação e do tempo para o estro e para a ovulação em ovelhas deslanadas. O protocolo curto com P4 antecipa os momentos do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação, bem como, sincroniza de forma mais eficiente o estro e a ovulação, enquanto que, o MAP atrasa o estro e a ovulação e resulta em baixa sincronia. Esses resultados mostram claramente que a sincronização do estro utilizando MAP pode resultar em variadas taxas de fertilidade pós inseminação artificial, sendo extremamente difícil prever qual seria o momento ideal para a realização da IATF.

Os motivos pelo qual o MAP é menos eficiente no protocolo de sincronização do estro não são claros. No presente estudo, alguns animais apresentam estro e ovulação precocemente (20 h e 44 h, respectivamente) enquanto outros apresentam tardiamente (65 h e 108 h), de acordo com achados anteriores (Moreira et al., 2014). Sabe-se que os progestágenos

apresentam longa meia-vida (Schindler et al., 2003) e que é possível que o MAP, juntamente com a progesterona endógena, apresente uma supressão superior sobre as concentrações de LH do que o P4 (Bartlewski et al., 2015). Além disso, a existência de uma alta diferença na farmacocinética do MAP entre indivíduos não pode ser descartada. Todos esses fatores, individualmente ou em conjunto, poderiam estar envolvidos na grande variação nos momentos do estro e da ovulação observados na utilização desse hormônio. Por outro lado, a concentração de MAP residual que permanece na esponja no momento da sua remoção varia entre indivíduos (Simonetti et al., 1999) e a utilização da esponja ocasiona diferentes graus de aderência do pessário na parede vaginal (Martins et al., 2010). Nos casos de elevado grau de aderência, a esponja necessita ser removida mecanicamente com os dedos exercendo uma grande compressão sobre a mesma, o que poderia levar a liberação do MAP residual na parede vaginal prolongando o seu efeito em alguns animais.

Uma vez que o protocolo com P4 resultou em uma boa sincronia da ovulação (8,9 horas), esse protocolo foi utilizado para realização do Experimento 2 e 3. Hipotetizou-se que a dispersão do momento da ocorrência da ovulação pode ter sido um dos principais fatores implicados na obtenção de baixas taxas de fertilidade com a inseminação artificial com sêmen congelado por via cervical. No presente estudo, a realização da IA mais precocemente em relação a hora da ovulação (8 horas antes) permitiria que aproximadamente 100% dos animais apresentassem espermatozoides viáveis no momento da ocorrência da ovulação, uma vez que, segundo Lightfoot & Salamon (1970), o sêmen congelado possui pelo menos 18 horas de viabilidade. Contudo, nem a IAC as 50 h, nem a IAC as 54h aumentaram a eficiência reprodutiva, resultando em baixas taxas de fertilidade (14,3% e 22,2%, respectivamente).

Muitos estudos mostram que a IA realizada o mais próximo possível do sítio da ovulação resulta no aumento da fertilidade (Salamon & Maxwell, 1995; Anel et al., 2005; Anel et al., 2006; Taqueda et al., 2011; Richardson et al., 2012). Como não houve diferença entre os dois horários utilizados no Experimento 2, o momento da IA no Experimento 3 foi realizado as 54 h devido a este ser o mais próximo da média da ovulação. A utilização da IA por laparoscopia às 54 horas juntamente com a sincronia da ovulação obtida com o protocolo com P4 resultou em uma taxa de fertilidade de 74,4%, que pode ser considerada excelente. Em contrapartida, os resultados para a IAC no Experimento 3 permaneceram com o mesmo padrão de baixa taxa de fertilidade com sêmen congelado que as do Experimento 2. Portanto, As baixas taxas de fertilidade encontradas no presente estudo estão de acordo com os dados de fertilidade utilizando IAC e sêmen congelado obtido por outros autores (Taqueda et al., 2011; Kumar & Naqvi, 2014).

Foi interessante notar que independente do momento da IAC no Experimento 2 as taxas de fertilidade permaneceram baixas, e o motivo porque isso ocorreu parece ser principalmente devido ao efeito prejudicial do processo de congelamento do sêmen sobre a cinética espermática e mitocôndrias o que prejudica o transporte espermático pela complexa barreira cervical de ovinos (Salamon & Maxwell, 1995; Anel et al., 2006). Diante da alta sincronia da ovulação no Experimento 1, da IAC ter sido realizada 4 e 8 horas antes da média da ovulação e da alta taxa de fertilidade alcançada na IAL no Experimento 3, pode-se dizer que os espermatozoides permanecem viáveis para a fertilização, entretanto, podem apresentar dificuldade em ultrapassar o cérvix para alcançar o sítio de fecundação, resultando em baixa taxa de fertilidade. Os resultados também mostram que em alguns animais os espermatozoides conseguem ultrapassar a barreira cervical obtendo taxas de fertilidade de 10 a 35% com sêmen congelado na IAC (Taqueda et al., 2011; Richardson et al., 2012). Isso possivelmente ocorra devido à poucos animais apresentarem uma menor complexidade na conformação cervical (Kaabi et al., 2006; Franco et al., 2014).

Em sumário, o protocolo com P4 leva a uma alta sincronia da ovulação e isso permite alcançar altas taxas de fertilidade com inseminação intrauterina por laparoscopia. Contudo, mesmo com alta sincronia da ovulação, o uso do sêmen congelado na IA por via cervical não resulta em altas taxas de fertilidade. A causa dessa baixa taxa de fertilidade na IAC provavelmente não está associada ao tempo de sobrevivência espermática no trato reprodutivo feminino e sim à dificuldade do espermatozoide submetido a criopreservação em ultrapassar a barreira cervical.

7 CONCLUSÃO

O protocolo curto com P4 antecipa o momento do início da manifestação do estro e da ocorrência da ovulação em relação ao MAP, e portanto, isto deveria ser considerado para a determinação do momento ideal para realizar a inseminação artificial em tempo fixo. Contudo, o protocolo com exposição curta a progesterona resulta em uma ótima sincronia dos momentos do início da manifestação do estro (14,9 h) e da ocorrência da ovulação (8,9 h), diferentemente da baixa sincronia do início do estro e da ocorrência da ovulação observadas no protocolo com MAP. Portanto, a utilização do protocolo curto com P4 é extremamente indicada para a realização de programas IATF em bovinos, enquanto que, a busca por soluções para melhorar a sincronia do início do estro e da ocorrência da ovulação com o protocolo com MAP, e conseqüentemente as taxas de fertilidade com este protocolo, ainda é uma realidade.

Mesmo com uma alta sincronia da ocorrência da ovulação, a utilização da inseminação artificial por via cervical superficial com sêmen congelado resulta em taxas de fertilidade abaixo de 25%. Nas condições do presente estudo, para alcançar valores próximos ou acima de 70% na taxa de fertilidade com a utilização do sêmen congelado em ovelhas deslanadas, os programas de IATF devem ser realizados com protocolo curto com progesterona natural seguido pela inseminação artificial por via laparoscópica com sêmen congelado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 173-179, Feb 2012.

ALLAOUI, A. et al. Comparative Study between Ovine Artificial Insemination and Free Mating in Ouled Djellal Breed. **APCBEE Procedia**, v. 8, p. 254-259, 2014.

ALVARES, C. A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec 2013.

ANEL, L. et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 30-42, Oct 2006.

_____. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235-1247, Mar 2005.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Comparison of the effects of pretreatment with Veramix sponge (medroxyprogesterone acetate) or CIDR (natural progesterone) in combination with an injection of estradiol-17 beta on ovarian activity, endocrine profiles, and embryo yields in cyclic ewes superovulated in the multiple-dose Folltropin-V (porcine FSH) regimen. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1225-1237, Oct 2015.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal**, 3ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.

FRANCO, M. C. et al. Morfologia da cérvix de ovelhas Santa Inês adultas nas fases luteínica e folicular. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 495-501, 2014.

KAABI, M. et al. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1876-1883, Nov 2006.

KUMAR, D.; NAQVI, S. M. K. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. **Journal of animal science and technology**, v. 56, p. 8, 2014.

- LIGHTFOOT, R. J.; SALAMON, S. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, p. 385-398, 1970.
- MARTINS, L. T. et al. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB[®]) for estrous synchronization in ewes. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 2, p. 389-395, Feb 2010.
- MAXWELL, W. M. C.; BUTLER, L. G. Intra-uterine insemination of ewes with frozen-semen. *Journal of Agricultural Science*, v. 102, p. 233-235, 1984.
- MOREIRA, N. H. et al. Utilização de FSH:LH como alternativa para estimular o crescimento folicular na sincronização do estro ovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.
- OLIVEIRA, M. E. F. et al. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in Santa Ines ewes under subtropical conditions. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 452-460, Feb 2016.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014. Disponível em: < <http://www.R-project.org/> >. Acesso em: 02 de Fevereiro.
- RICHARDSON, L. et al. Effect of site of deposition on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 3-4, p. 160-164, Apr 2012.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. 2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1-2, p. 1-36, Mar 1995.
- SANTOLARIA, P.; PALACIN, I.; YANIZ, J. **Management factors affecting fertility in sheep**. Artificial insemination in farm animals. MANAFI, M.: Intech: 312 p. 2011.
- SANTOS-NETO, P. C. et al. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. **Livestock Science**, v. 182, p. 125-128, Dec 2015.
- SCHINDLER, A. E. et al. Classification and pharmacology of progestins. **Maturitas**, v. 46, p. S7-S16, Dec 2003.
- SIMONETTI, L.; RAMOS, G.; GARDON, J. C. Estrus presentation and distribution in ewes treated with intravaginal sponges impregnated with medroxyprogesterone acetate (MAP) in combination with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 5, p. 236-239, 1999.
- SWELUM, A. A. A.; ALOWAIMER, A. N.; ABOUHEIF, M. A. Use of fluorogestone acetate sponges or controlled internal drug release for estrus synchronization in ewes: Effects of hormonal profiles and reproductive performance. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 498-503, Sep 2015.

TAQUEDA, G. S. et al. Influence of anatomical and technical aspects on fertility rate based on sheep transcervical artificial insemination performance. **ARS Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 127-133, 2011.

THOMPSON, J.; MEYER, H. **Body condition scoring of sheep**. UNIVERSITY, O. S. Corvallis: OSU Extension Catalog 1994.

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 1, p. 63-66, Oct 2002.

VINOLES, C. et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 993-1004, Mar 2001.

VINOLES, C. et al. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1351-1361, May 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sincronização eficiente do estro e ovulação ainda é um desafio que necessita ser superado em cada raça, no mundo, para viabilizar e maximizar o uso da inseminação artificial em tempo fixo com sêmen congelado. O presente estudo permitiu ajustar um protocolo eficiente de sincronização do estro para ovelhas da raça Santa Inês, viabilizando a utilização do sêmen congelado em um programa de IATF utilizando-se inseminação artificial por via laparoscópica.

A caracterização da fisiologia reprodutiva de ovelhas deslanadas da raça Santa Inês, nas diferentes épocas do ano, em 15° de latitude Sul e clima tropical, sob diferentes regimes de sincronização do estro, mostrou que a utilização de protocolo longo ou curto de sincronização do estro utilizando MAP resulta em baixa sincronia da ovulação, não sendo recomendada a sua utilização. Contudo, para não inviabilizar a utilização do MAP na sincronização do estro ovino, novos estudos devem ser realizados para avaliar a sincronia do início da manifestação do estro e ocorrência da ovulação em protocolos com MAP + eCG associados à diferentes indutores de ovulação.

A utilização da progesterona, nas condições do presente estudo, em um protocolo longo ou curto de sincronização, resulta em uma alta sincronia da ovulação, contudo, o protocolo curto parece ser mais eficiente pois resulta em uma alta sincronia da ovulação, em aproximadamente 8 horas. A utilização desse protocolo associado em um programa de inseminação artificial em tempo fixo, com a deposição do sêmen congelado por via laparoscópica, às 54 horas após a remoção do pessário, resulta em uma taxa de gestação acima de 70%.