LILIAN MARA KIRSCH DIAS

**Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo
da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização
de estros em ovelhas Santa Inês**

São Paulo

2011

LILIAN MARA KIRSCH DIAS

**Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da
dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em
ovelhas Santa Inês**

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2011

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 031992

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2467
FMVZ

Dias, Lilian Mara Kirsch

Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em ovelhas Santa Inês / Lilian Mara Kirsch Dias. -- 2011.
96 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Ovelha. 2. Progesterona. 3. Hormônios. 4. Folículo. 5. Reprodução.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da administração do hCG pós-monta na concentração plasmática de progesterona, indução de corpos lúteos acessórios e performance reprodutiva de ovelhas Santa Inês", protocolado sob o nº1208/2007, utilizando 420 (quatrocentos e vinte) ovelhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "Effects of hCG administration post mating on plasma progesterone concentration, induction of accessory corpus luteum and reproductive performance of Santa Inês ewes", protocol number 1208/2007, utilizing 420 (for hundred twenty) ewes, under the responsibility Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DIAS, Lilian Mara Kirsch

Título: Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em ovelhas Santa Inês

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Reprodução Animal da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

**AO MEU AMADO PAI, EDSON ANTONIO
DIAS, PELA SUA PRESENÇA E
INCONDICIONAL AMOR, APOIO,
CARINHO, DEDICAÇÃO E
COMPANHEIRISMO**

**À MINHA AMADA MÃE, IRENE KIRSCH
DIAS, MEU ETERNO ANJO DA GUARDA**

DEDICO....

AGRADECIMENTOS

“AGRADEÇO DO FUNDO DO MEU CORAÇÃO A ENORME AJUDA DE TODOS!

Sem vocês eu não conseguiria, são anjos em meu caminho”

AGRADEÇO IMENSAMENTE....

Ao meu pai, Edson Antonio Dias, meu paizão! Obrigada por todas as nossas conversas, seu apoio incondicional, amor, carinho, presença. Agradeço por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e, principalmente por não se ausentar nos períodos de tempestade. Sua força me permitiu continuar! Te amo muito!

Aos meus parentes. Obrigada pelo apoio e torcida, em especial à minha Tia Ednasir, as maravilhosas conversas e deliciosos bolos que adoçaram muitos momentos de estudo.

À minha querida amiga de infância, Luciana C. Garcia, a sua eterna amizade, compreensão e carinho. Te adoro Lu! Obrigada pelos longos papos e gostosas risadas, que SEMPRE me ajudaram a seguir em frente.

À minha amiga Renata Hiramatsu e seus pais, Maria e Carlos, os conselhos, carinho, apoio e amizade. Vocês me transmitem uma perfeita paz de espírito, de que os amigos sempre estarão lá! Obrigada!

Às minhas grandes amigas, Thaisa Campos, Viviane Franco, Lilian Aveiro e Samah a enorme sintonia, apoio em todos os momentos, amigas preciosas!

Ao meu parceiro e amigo, Emilson Nogueira da Cunha, seu amor, carinho, conversas, ajudas, passeios, viagens e maravilhosos momentos juntos.

Ao meu orientador, Claudio Alvarenga de Oliveira. Agradeço a oportunidade, confiança, orientação e acima de tudo o seu companheirismo e amizade.

À minha grande amiga e parceira de pesquisa, Marina B. Paes de Barros. Poucas pessoas teriam a mesma disposição em ajudar. Obrigada Má! Sua presença de espírito em tudo o que faz garantiu o sucesso do nosso trabalho e de nossa amizade!

À grande amiga Priscila Viau Furtado, sua ajuda não só nos trabalhos, com as exaustivas dosagens hormonais e planejamento dos experimentos, mas principalmente pela sua amizade, presença de espírito, alegria, segurança, que me auxiliaram não só para o doutorado como também para a vida! Obrigada Pri!!!

Ao meu querido amigo Samir S. Nicolau. Agradeço toda ajuda não só nos trabalhos, como também pelos inúmeros chocolates compartilhados, piadas, conversas que sempre me arrancaram sorrisos.

Ao meu querido amigo José Nélio S. Sales. Pessoa incrível, por quem tenho enorme carinho e admiração. Obrigada por toda ajuda, desde os tempos da graduação, passando pelo mestrado e doutorado, a dívida é enorme! Obrigada Zé!!!

Aos professores e amigos Ed Hoffman Madureira e Nadja Gomes Alves, o carinho e a enorme contribuição com os trabalhos.

Ao Dr Renato Valentim, a essencial contribuição na elaboração dos protocolos e fornecimento dos dispositivos de progesterona.

Às Professoras Roberta Assis e Anelise Traldi que me contaminaram com seu entusiasmo pelo mundo dos pequenos ruminantes

Aos funcionários do Departamento: Ira O. da Silva, José Carlos dos Santos Belau, Josimar e Luiz Fernandes Ferreira de Sena não só pela pronta ajuda na execução dos experimentos como pelo carinho e dedicação com que me auxiliaram.

Aos funcionários: Miguel Tadeu Lino de Freitas, Thaís Soto Longarço, Sílvia Eduardo Rezende e Sandra; eu agradeço a ajuda e o enorme carinho que ecoava do “Bom Dia!” de todas as manhãs.

Ao funcionário, Anderson Luiz Avansi, a companhia durante as corridas no CPUSP, momentos importantes para aliviar o estresse e dar boas risadas.

Agradeço em especial à funcionária Harumi Doi Shiraishi, a sua imprescindível ajuda, amizade e apoio em todos os momentos, principalmente diante das assustadoras e intermináveis burocracias. Harumi, sem seu excelente trabalho e organização tudo seria mais difícil. Obrigada!

Aos colegas, pós-graduandos e professores do Departamento de Reprodução Animal, meus sinceros agradecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o auxílio à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), a bolsa de estudos.

Às empresas: Hertape-Calier e Tecnopec, o fornecimento dos hormônios.

E finalmente, agradeço com profundo respeito e consideração, a todos os animais que participaram da pesquisa. E a Deus por tornar tudo isso possível!

“ Escolha a alegria;

Confie na vida;

Acredite no bem;

Faça o melhor

Seja feliz! “

(Lucius)

RESUMO

DIAS, L. M. K. **Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em ovelhas Santa Inês.** [Effect of hCG administration for ovulation induction and follicular dynamics evaluation during a nine day estrus synchronization protocol in Santa Inês ewes]. 2011. 96 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração de hCG na indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em ovelhas cíclicas da raça Santa Inês. O experimento foi dividido em duas etapas consecutivas. Na primeira etapa, em dia aleatório do ciclo estral (D0), 9 ovelhas receberam um novo dispositivo intravaginal de progesterona (Primer-PR®, Tecnopec, Brasil). Nove dias após (D9) o dispositivo foi retirado, administraram-se 30 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Syntex, Argentina) e 250 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda). A partir deste momento, as ovelhas foram alocadas, aleatoriamente, a um de dois tratamentos: Grupo controle (GC) e Grupo hCG (GhCG). No GC, as ovelhas não receberam nenhum tipo de indutor de ovulação. No GhCG, 24 horas após a retirada do dispositivo, foram administrados, via i.m., 500 UI de hCG (Vetecor®, HertapeCalier, Espanha). Após um intervalo de 30 dias foi realizada uma réplica alternada do experimento (etapa 2), ou seja, as ovelhas que na primeira etapa estavam no grupo controle foram alocadas no grupo hCG e vice-versa. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Houve regressão de todos os folículos presentes no início do tratamento e emergência da onda ovulatória, em média, $3,54 \pm 1,5$ e $7,88 \pm 1,05$ dias da colocação do dispositivo, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos quanto ao diâmetro do primeiro folículo pré-ovulatório (GC: $5,78 \pm 0,30$ mm vs. GhCG: $5,36 \pm 0,69$ mm; $P=0,09$) e segundo folículo pré-ovulatório (GC: $5,41 \pm 0,85$ vs. GhCG: $4,71 \pm 0,50$; $P=0,08$) em ovelhas com ovulações duplas. Observou-se maior proporção ($P=0,009$) de comportamento de estro nos animais do GC (9/9) quando comparado ao GhCG (3/8). Não houve diferença significativa entre os grupos no intervalo médio entre retirada do dispositivo e início ($47,4 \pm 15,0$ no GC e $32,0 \pm 0,0$ no GhCG, $P=0,11$) ou na duração do estro ($36,22 \pm 18,57$ h no GC e $38,6 \pm 30,6$ h no GhCG, $P=0,72$). A concentração de progesterona sérica entre os dias D0 e D8 não diferiu estatisticamente ($P=0,49$) entre os grupos (CG: $11,06 \pm 4,82$

ng/ml vs GhCG: 9.74 ± 4.37 ng/ml). As ovelhas do grupo hCG apresentaram menor intervalo entre retirada do dispositivo e ovulação (GC: $79,9 \pm 15,4$ h vs. GhCG: $54,7 \pm 4,9$ h; $P=0,001$). Além disso, os animais que receberam hCG tiveram as ovulações mais sincronizadas. Conclui-se que a administração de hCG antecipa e promove ovulações mais sincronizadas, o que pode ser importante para aumentar a eficiência da inseminação em tempo fixo.

Palavras-chave: Ovelha, Reprodução, Progesterona, Hormônio, Folículo

ABSTRACT

DIAS, L. M. K. **Effect of hCG administration for ovulation induction and follicular dynamics evaluation during a nine day estrus synchronization protocol in Santa Inês ewes.** [Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em ovelhas Santa Inês]. 2011. 96 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The aim of this study was to evaluate the effect of hCG administration for ovulation induction and assessment of follicular dynamics on a nine day estrus synchronization protocol in Santa Inês cycling ewes. The experiment was conducted in two consecutive steps. In a random oestrus cycle day (D0), 9 ewes received a new intravaginal progesterone device (Primer-PR®, Tecnopec, Brasil). Nine days after (D9), 30 µg of d-cloprostenol (Prolise®, Syntex, Argentina) and 250 IU of eCG (Folligon®, Intervet, Holanda) were administered and the progesterone device was removed. After this procedure, the ewes were randomly assigned to one of two treatments: Control Group (CG) and hCG Group (hCGG). In CG, ewes did not receive any ovulation inductor. In hCGG, 500 IU were administered (Vetecor®, HertapeCalier-Spain), intramuscular, 24 hours after device removal. After a 30 day interval, a replicate of the experiment was performed (phase 2), in which control group animals were allocated into hCG group and vice versa. In this study a randomized experimental design was used with repeated measures over time. In the present study it was observed regression of all follicles present on the day of device insertion and follicular wave emergence occurred averagely 3.54 ± 1.5 and 7.88 ± 1.05 days after device insertion, respectively. There was no difference between groups regarding the first preovulatory follicle diameter (CG: 5.78 ± 0.30 mm vs. hCGG: 5.36 ± 0.69 mm; $p=0.09$) and the second preovulatory follicle (CG: 5.41 ± 0.85 vs. hCGG: 4.71 ± 0.50 ; $P=0.08$) for ewes with double ovulations. CG animals showed a higher proportion of estrus behavior ($P=0.009$) than hCGG. There was no difference between groups regarding average interval from device removal and estrus onset (CG: 47.4 ± 15.0 and hCGG: 32.0 ± 0.0 , $P=0.11$) or on estrus duration (36.22 ± 18.57 h on CG and 38.6 ± 30.6 h on hCGG, $P=0.72$). Serum progesterone concentration between D0 and D8 did not differ ($P=0.49$) between groups (CG: 11.06 ± 4.82 ng/ml and hCGG: 9.74 ± 4.37 ng/ml). hCG group ewes had smaller interval between device removal and ovulation (CG: 79.9 ± 15.4 h vs. hCGG: 54.7 ± 4.9 h; $P=0.001$). Animals

given hCG had more synchronized ovulations. It can be concluded that hCG administration hastens and improves ovulatory synchronization, which could be important to increase fixed time insemination efficiency.

Keywords: Ewe, Reproduction, Progesterone, Hormone, Follicle

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O CENÁRIO DA OVINOCULTURA.....	18
2.2 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA E A RAÇA SANTA INÊS	20
2.3 FISIOLOGIA REPRODUTIVA	23
2.3.1 Ciclo estral	24
2.3.2 Regulação neuro-endócrina	24
2.3.2.1 Regulação neuro-endócrina do corpo lúteo.....	27
2.3.3 Fisiologia e composição do corpo lúteo (CL).....	28
2.3.3.1 Produção de progesterona pelo corpo lúteo.....	29
2.3.3.2 Luteólise	30
2.3.4 Reconhecimento materno e fisiologia da gestação	31
2.4 ULTRASSONOGRAFIA E DINÂMICA FOLICULAR	33
2.4.1 Dominância folicular	36
2.5 PROTOCOLOS HORMONAIS	39
2.5.1 Principais hormônios e dispositivos utilizados	39
2.5.2 Período do protocolo	41
2.6 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG)	42
2.7 GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)	44
2.8 ESTUDOS COM PROTOCOLOS HORMONAIS EM OVINOS	49
3 OBJETIVO	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS	56
4.2 TRATAMENTOS	57
4.3 EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS	58
4.4 RUFIAÇÃO PARA A DETECÇÃO DO ESTRO	60
4.5 COLHEITAS DE SANGUE PARA DOSAGEM DE PROGESTERONA....	60
4.6 ANÁLISE DA PROGESTERONA POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE)	60
4.7 METODOLOGIAS DAS ANÁLISES	61
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
5 RESULTADOS.....	63
5.1 GRÁFICOS DE DINÂMICA FOLICULAR.....	63

6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A criação dos pequenos ruminantes foi a primeira atividade zootécnica desenvolvida pelo homem. Estes animais têm contribuído para o avanço da humanidade com sua rusticidade, adaptabilidade a diversos ambientes, curto intervalo entre partos, prolificidade, facilidade de manejo e excelente qualidade de seus produtos: carne, pele, lã, leite e derivados.

No Brasil houve um recente aumento da produção e consumo de produtos ovinos; impulsionados pela difusão da exploração, antes restrita às regiões nordeste e sul do país, e pela melhoria da qualidade de vida e poder aquisitivo da população. Contudo, ressalta-se neste cenário o fato de que a produção não atende à demanda. Mesmo com a enorme disponibilidade de recursos naturais, o Brasil ainda é um país importador da carne de ovinos.

Uma das principais causas desta baixa oferta de produtos decorre da incapacidade dos produtores em atender às necessidades do mercado consumidor, que exige produtos de qualidade, uniformidade, em larga escala e baixo custo (AZEVEDO; ANTONIALLI, 2008).

A principal alternativa para impulsionar a cadeia da ovinocultura e tornar a criação economicamente viável é a implantação de um manejo reprodutivo eficiente. Neste contexto, o controle da reprodução com o uso de protocolos hormonais oferece três principais vantagens: (1) escolha do melhor período de parição (2) nascimento sincronizado de filhotes em menor período (otimização e concentração de mão-de-obra, redução da mortalidade neonatal, fornecimento homogêneo de produtos) e (3) manejo genético (seleção genética e armazenamento de material genético - FATET et al., 2010).

O protocolo hormonal, quando eficiente, ou seja, quando sincroniza não só o estro, mas a ovulação, permite a associação da técnica de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Esta técnica já difundida na criação de bovinos, se bem implantada, traz benefícios econômicos à produção pois, além de possibilitar aumento da pressão de seleção sobre os machos, que leva ao melhoramento genético do rebanho e concentrar os trabalhos veterinários, diminui custos com erros

na detecção de cios (MENCHACA; RUBIANES, 2004; TORRES-JÚNIOR et al., 2009).

Visto que os protocolos hormonais existentes não sincronizam a ovulação de forma eficiente (BARRETT et al., 2008), não resultam em altas taxas de gestação com a IATF. Por isto, os programas de inseminação artificial em ovelhas necessitam da visualização do estro para inseminação, o que traz resultados variáveis e aumentam o custo com mão-de-obra, alimentação e manejo (REYNA et al., 2007).

Em geral, os protocolos têm como base a utilização de uma fonte exógena de progesterona ou progestágeno, associado às aplicações de prostaglandina e gonadotrofina coriônica equina (eCG) (MENEGATOS et al., 2003; BARRETT et al., 2004; REYNA et al., 2007). Na literatura os trabalhos mais recentes apresentam o período de manutenção da progesterona exógena diminuído (UNGERFELD; RUBIANES, 1999), tradicionalmente utilizado por 12 a 14 dias, pois podem causar baixa fertilidade por distúrbios no desenvolvimento folicular (VIÑALES, et al., 2001; MENCHACA et al., 2004; LETELIER, et al., 2010; HUSEIN; ABABNEH, 2008).

Recentemente, Paes de Barros (2010) propôs um protocolo hormonal de nove dias de sincronização com a utilização de um novo dispositivo de liberação lenta de progesterona. Este dispositivo é de silicone e, entre suas qualidades, ressaltam-se o baixo custo e o fácil manejo, pois evita a ocorrência de vaginite e aderência. Este protocolo foi eficiente em sincronizar a emergência da onda ovulatória, mas houve grande dispersão entre as ovulações, o que inviabiliza sua utilização para IATF com sêmen refrigerado ou descongelado, pelo seu menor período fértil (DOMINGUEZ et al., 2008). Uma das alternativas para contornar este problema seria associar um hormônio indutor da ovulação, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG).

A Santa Inês é considerada uma raça nativizada, e portanto, rústica, adaptada aos diferentes climas e regiões do país, com grande resistência à parasitose gastrointestinal e doenças ambientais, possui boa habilidade materna, boa precocidade e rendimento de carcaça, razoável prolificidade, sendo uma das raças mais difundidas no país.

Portanto, diante da necessidade de controlar a reprodução dos animais da raça Santa Inês no país e para tanto, melhorar a eficiência dos protocolos de sincronização da ovulação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da hCG no protocolo hormonal de nove dias de sincronização do estro e da ovulação com a utilização de um novo dispositivo de progesterona em ovelhas Santa Inês.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi dividida em tópicos e abordará os seguintes temas: cenário da ovinocultura, estacionalidade reprodutiva e a raça Santa Inês, fisiologia reprodutiva, reconhecimento materno da gestação, ultrassonografia e dinâmica folicular, protocolos hormonais, o uso da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG).

2.1 O CENÁRIO DA OVINOCULTURA

No cenário mundial, o rebanho brasileiro de ovinos obtém número bastante inferior (16,6 milhões de cabeças) se comparado aos países com maior rebanho: China com 285 milhões de cabeças e Índia com 190 milhões (ANUALPEC, 2010).

Na década de 90 no Brasil, houve um momento de dificuldade na ovinocultura, quando a região sul, que na época detinha 56,29% de todo o rebanho, criava os animais para a produção de lã. Com o advento das fibras sintéticas e a crise no preço da lã, os produtores tiveram que diminuir seus rebanhos e mudar o perfil da criação para carne. Com essa crise, o rebanho brasileiro diminuiu seu efetivo em aproximadamente 30% até 2000, sendo que só a partir de 2002, o rebanho voltou a crescer novamente, com uma média de aproximadamente 3% ao ano até 2005. E em 2008, o crescimento foi de 2,4% ao ano (VIANA, 2008).

Algumas regiões brasileiras vêm tomando espaço no cenário da ovinocultura, não somente pelo crescimento, mas principalmente pelo potencial que possuem para a atividade, como é o caso do Sudeste e Centro Oeste, com destaque para o Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. No entanto, o nordeste hoje detém o maior rebanho, com mais de 9 milhões de cabeças, seguido pela região sul, com quase 4,5 milhões (ANUALPEC, 2009).

Este número crescente também revela um maior interesse pela carne do cordeiro, considerado um prato requintado na alta gastronomia, fator que tem

colaborado para maior demanda pelo produto. Com base nos números do IBGE, só para suprir a cidade de São Paulo, um dos polos mais prósperos para a ovinocultura de corte no país, seriam necessários mais de dois milhões de cabeças; quase três vezes mais que o existente em toda região sudeste (HEYMEYER, 2010).

Segundo dados da FAO (2003), mesmo com o aumento do consumo da carne ovina no Brasil nos últimos anos (0.5 kg/hab/ano para 0.7 kg/hab/ano), este ainda está abaixo da média de outros países como, por exemplo, a Nova Zelândia que consome 49,6 kg/hab/ano. Além disso, de acordo com o Anualpec (2010) o consumo per capita de carnes do brasileiro está por volta dos 92,1 kg/hab/ano, sendo que o de carne ovina representa menos que 1% deste montante.

Apesar de alguns dados demonstrarem que o brasileiro está se interessando pela carne de cordeiro e que a produção vem se difundindo para outras regiões do país (Sudeste e Centro-Oeste), a indústria ovina se desenvolve muito lentamente, e não existe produção interna nem para suprir o mercado consumidor brasileiro, quanto mais o mercado externo.

Portanto, o Brasil caracteriza-se por ser um país importador de carne ovina, pois a produção supre apenas 20% do mercado interno. As importações por parte do Brasil vêm aumentando desde 2002 e, segundo dados de MDIC (Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio), só no mês de março de 2010, houve um aumento de 36% em volume e 78% em valor quando comparado ao mesmo período de 2009. Isto ocorre devido à histórica desorganização da cadeia produtiva que inviabiliza a produção de cortes de qualidade e na quantidade necessária (HEYMEYER, 2010).

Outra desvantagem desta realidade é que o produto importado, na maioria do Uruguai, e geralmente fornecido em churrascarias, é uma carne de qualidade inferior em comparação à produzida no Brasil (SIMPLÍCIO, 2011). Como resultado, aquele consumidor que nunca provou da carne ovina e resolve experimentar nesses locais, e não em restaurantes especializados no preparo deste prato, acaba não apreciando, o que dificulta ainda mais o aumento da demanda pelo produto e a inversão de cultura para consumo da carne ovina.

A ovinocultura brasileira deve deixar para trás a condição de exploração de subsistência e ganhar espaço como atividade empresarial, especializada, planejada, organizada e orientada para a qualidade. A demanda é maior que a oferta, havendo um mercado consumidor, em crescimento, apreciado mundialmente, e que não

possui restrições religiosas e/ou culturais. No entanto, para se conseguir entrar neste mercado, é preciso oferecer um produto padronizado, com constância de fornecimento e qualidade garantida (SIMPLÍCIO, 2011).

Para isto deveria existir um elo entre entidades governamentais, produtores, comerciantes, pesquisadores e empresas para fortalecer esta cadeia produtiva e trazer rentabilidade ao país.

Se considerarmos a participação dos produtores, a solução seria a utilização de raças especializadas, controle sanitário, nutricional, zootécnico e implantação de estação reprodutiva. Para garantir a rentabilidade com a produção de carne de cordeiro é necessário ter escala de produção e para isso são necessários planejamento e investimento em tecnologias. (HEYMEYER, 2010).

Diante disso, considerando a área de pesquisa, o aumento de escala de produção, com fornecimento constante só será possível com estudos, principalmente na área reprodutiva, como o desenvolvimento de um protocolo hormonal eficiente.

2.2 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA E A RAÇA SANTA INÊS

A sazonalidade reprodutiva na ovelha é caracterizada por mudanças em níveis comportamentais, endócrinos e ovulatórios, com alteração anual em dois períodos distintos: estação de acasalamento caracterizada por uma sucessão de intervalos regulares (média de 17 dias), se a gestação não desenvolver, com comportamento de estro e ovulação; e uma estação de anestro caracterizada pela ausência da atividade sexual (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007).

O fotoperíodo influencia a reprodução pelo padrão de secreção da melatonina pela glândula pineal. A melatonina é secretada durante as horas de escuro e, portanto, o período de secreção da melatonina a cada 24 horas irá variar de acordo com o comprimento do dia. As informações captadas pela retina são transmitidas ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo, e através dos nervos torácicos espinhais, passam pelo gânglio cervical superior até chegarem à glândula pineal. A região em

que a melatonina interage e seu mecanismo para regular a sazonalidade reprodutiva ainda não estão claros (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007; GOODMAN et al., 2010).

Tanto a atividade ovulatória como comportamento de estro demonstram uma variação sazonal paralela, mas existem algumas discrepâncias no início e fim da estação sexual, quando algumas ovulações não são acompanhadas de comportamento estral. Isto ocorre porque as ovelhas necessitam de um período inicial de exposição à progesterona para demonstrar sinais de estro, e geralmente somente após o fim do primeiro ciclo ovariano o comportamento de estro é exibido (LAND et al., 1973).

Durante a estação de anestro ocorrem crescimento e regressão folicular e podem estar presentes folículos de mesmo diâmetro daqueles encontrados na estação de acasalamento (HUTCHINSON; ROBERTSON, 1966). O LH continua a ser liberado, em episódios, mas em menor frequência se comparado com a estação reprodutiva (ROSA; BRYANT, 2003). Devido a esta supressão do LH, acredita-se que o FSH tem o potencial de estimular o desenvolvimento de folículos antrais a um tamanho pré-ovulatório durante o anestro de ovelhas. Esta observação está de acordo com sugestões de que o LH tem importância predominante na fase de crescimento terminal, maturação e ovulação de folículos antrais (SEEKALLU; TOSSI; RAWLINGS, 2009). Contudo, a maior diferença em relação aos níveis endócrinos entre os períodos de anestro e estação de acasalamento ocorre na concentração plasmática de progesterona que permanece em teores não detectáveis durante o anestro. Os níveis de FSH parecem não ser significativamente diferentes daqueles encontrados durante a estação reprodutiva (ROCHE et al., 1970).

Existem vários fatores que influenciam o período de ovulação, incluindo: fotoperíodo (RAWLINGS et al., 1977; LINCOLN, 1992), raça, condição nutricional, escore corporal (VIÑALES et al., 1999), idade (WALKER et al., 1989) e efeito macho (RAVINDRA et al., 1994; LEYVA; BUCKRELL; WALTON, 1998; GIBBONS et al., 1999).

Já está claro na literatura que raças de ovelhas oriundas de regiões com latitudes médias e altas são raças sazonais e usam a variação do fotoperíodo como um marcador do ciclo reprodutivo anual. Ovelhas originárias de locais entre 35°N e 35°S têm a tendência de ciclar o ano todo, enquanto que em locais com latitude maior de 35° é normal encontrar ovelhas que são poliétricas sazonais e cujo início

da estação de acasalamento coincide com o declínio do comprimento do dia. Em geral, quanto maior a latitude maior a dependência do fotoperíodo e mais restrito o período de estação de acasalamento (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em regiões tropicais, próximas à linha do Equador, onde não existe variação da luminosidade diária ao longo do ano, existe uma tendência das raças nativas apresentarem-se como poliéstricas não estacionais. Neste caso, a estacionalidade da atividade reprodutiva é dependente de outros fatores como: temperatura, raça e nutrição (ROCHA et al., 2004). No Brasil, ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova e SRD (sem raça definida) de raças nativas (ou nativizadas) brasileiras apresentam atividade reprodutiva durante todo o ano, o que não acontece com ovinos lanados, como Ille de France, Suffolk e Merino (FONSECA, 2005).

Na região Sudeste do Brasil, as particularidades da atividade reprodutiva das ovelhas deslanadas ainda não são totalmente conhecidas. Trabalho realizado no estado de São Paulo que estudou a atividade cíclica reprodutiva ao longo do ano de fêmeas das raças Suffolk, Romney Marsh e Santa Inês, demonstrou diferenças consideráveis na incidência de estros entre raças lanadas e deslanadas. A maioria dos estros observados nas fêmeas lanadas se concentrou durante o outono e inverno, enquanto nas fêmeas da raça Santa Inês, o percentual de estros foi distribuído equitativamente ao longo do ano (SASA et al., 2002). Observações de campo mostram que a fêmea Santa Inês pode ter atividade reprodutiva ao longo do ano, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, contanto que receba nutrição adequada nos períodos da contra-estação reprodutiva.

Muitas raças de ovinos foram trazidas pelos colonizadores às Américas. Estes animais sofreram seleção natural por vários anos em determinados ambientes, adquirindo certas qualidades importantes para a sobrevivência como: rusticidade, prolificidade e resistência a endo e ectoparasitas assim como às doenças de cada região (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002). A ovelha Santa Inês é considerada uma raça nativizada e com notável dominância no cenário nacional (CARNEIRO et al., 2010). Segundo registros da Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) o rebanho Santa Inês é da ordem de 100 mil cabeças, sendo esta a raça de maior ganho de visibilidade no país nos últimos anos (TOMASINI, 2010).

Segundo dados do trabalho de Carneiro et al. (2010), atualmente, a média de peso ao nascer da raça Santa Inês é de 3,72 kg e o peso médio de adulto é de

76,08 Kg. Estes autores comentam que a raça Santa Inês se divide em: “velha Santa Inês”, que segundo criadores e técnicos, são animais menores e mais rústicos, predominantes nas décadas de 80 e 90; e a “nova Santa Inês”, mais prevalente nos dias de hoje, sendo animais maiores e com a garupa mais desenvolvida. Isto, provavelmente devido mais ao cruzamento com outras raças do que devido a uma seleção dentro da própria raça Santa Inês (CARNEIRO et al., 2010).

A Santa Inês se destaca, tanto pura, como em cruzamentos, mostrando sua criação em grande escala na região Nordeste, sua expansão no Centro-Oeste e mais recentemente na região Sudeste do país (RAMOS et al., 2007). É uma raça muito promissora para a produção de carne, pois demonstra precocidade, boa prolificidade (frequentes partos gêmeos), bom rendimento de carcaça, boa adaptabilidade às condições climáticas do Brasil, grande resistência às doenças ambientais e em condições favoráveis, são férteis durante todo ano (ROCHA; AMARANTE; BRICARELLO, 2004; MALHADO et al., 2009). Amarante et al. (2009) observaram que a raça Santa Inês no cruzamento com Dorper, Ile de France, Suffolk e Texel manteve satisfatório grau de resistência à infecção contra *H. contortus*, um dos principais parasitas gastrointestinais dos ovinos (ALMEIDA et al., 2010), quando comparada às raças puras.

Portanto, devido à importância desta raça em nosso país e o fato da compreensão do padrão de desenvolvimento folicular de cada raça ser um passo importante para o desenvolvimento de técnicas que maximizem a fertilidade em ovelhas (ALI; DERAR; HUSSEIN, 2006), neste trabalho priorizou-se a utilização da ovelha Santa Inês.

2.3 FISILOGIA REPRODUTIVA

A Fisiologia Reprodutiva foi dividida em tópicos e abordará os seguintes temas: ciclo estral, regulação neuro-endócrina, fisiologia e composição do corpo lúteo, produção de progesterona pelo corpo lúteo, luteólise e reconhecimento materno da gestação

2.3.1 Ciclo estral

A duração média do ciclo estral na ovelha é 17 dias ± 2 dias, sendo caracterizada entre os dias 14 (estro=dia 0) até o dia primeiro por uma fase estrogênica ou proliferativa, na qual estão contidos o proestro e o estro, entre os dias dois e 13 por uma fase progesterônica ou secretória, da qual fazem parte o metaestro e o diestro. O estro é o período do ciclo estral que coincide com o máximo desenvolvimento dos folículos e sua duração varia de acordo com a espécie, raça, idade, estação do ano, presença do macho e com o indivíduo. Na ovelha o estro tem duração média de 36 horas, podendo variar de 20 a 48 horas. A ovulação nesta espécie é espontânea e ocorre de 21 a 33 horas após início do estro. A ovelha em estro se aproxima do carneiro enquanto este inicia o comportamento de corte, ela abana a cauda e vira a cabeça para trás para olhar o carneiro. Geralmente ocorre corrimento vaginal com secreção mucosa. Ovelhas fora do estro irão agachar e urinar com a aproximação do carneiro e se afastar se ele se aproximar de forma agressiva. Para ocorrer a manifestação do estro é necessário um priming de progesterona, seguido pela sua retirada e exposição ao estradiol (JEFFCOATE; RAWLINGS; RIEGER, 1984 ; RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007).

2.3.2 Regulação neuro-endócrina

A função do eixo hipotalâmico-hipofisário é essencial para reprodução de mamíferos. O controle neural do ciclo estral é manifestado primariamente pela secreção de GnRH do hipotálamo, sendo portanto, este decapeptídeo o responsável por iniciar a cascata de eventos que regulam as gônadas. Gonadotrofos hipofisários, em parte, são responsáveis por expressar receptores específicos para o GnRH. A ativação destes receptores pelo GnRH, inicia um mecanismo de transdução de sinais intracelulares para induzir a síntese e liberação de gonadotrofinas, LH e FSH pela hipófise (NETT et al., 2002).

O GnRH, e portanto, o LH e o FSH são liberados de maneira pulsátil na ovelha. Durante a fase lútea do ciclo estral ovino, a frequência de pulsos de LH é baixa (1 a 2 pulsos a cada 6 horas) (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007). Esta baixa frequência de pulsos de LH ocorre devido ao efeito de feedback negativo da progesterona (GOODMAN; KARSH, 1980; JEFFCOATE; RAWLINGS; RIEGER, 1984; RAWLINGS; COOK, 1993).

Seekallu, Toosi e Rawlings (2009) avaliaram a administração de GnRH durante a fase luteal do ciclo estral de ovelhas, quando a frequência de pulsos de LH é mínima. O tratamento criou pulsos de LH com frequência similar ao período folicular. Já a secreção de FSH foi não pulsátil e não demonstrou respostas ao GnRH. Isto é esperado, uma vez que a secreção de FSH é largamente constitutiva e não ocorre em resposta aos pulsos de GnRH.

Em ovelhas cíclicas, o efeito de feedback negativo da progesterona na secreção de FSH não é tão marcada ou tão consistente como é para o LH. No experimento de Sekallu, Tossi e Rawlings. (2009), a inserção de um implante de progesterona durante a fase luteínica do ciclo estral de ovelhas resultou em diminuição da frequência de pulsos de LH pela metade daquela observada no grupo controle. No entanto, esta supressão dos pulsos de LH abaixo do esperado numa fase luteínica, não resultou em nenhum efeito na emergência, crescimento e regressão dos folículos em desenvolvimento nas ondas foliculares. Esta observação demonstra que, em ovelhas cíclicas, são necessários poucos pulsos e baixa concentração sérica de LH para manter a emergência e o crescimento da onda folicular. Neste experimento, a concentração de FSH não foi significativamente afetada. Acredita-se que, a redução da frequência de pulsos de LH durante a fase luteínica garante o crescimento e o desenvolvimento final do folículo, enquanto que o aumento da frequência de pulso do LH durante a fase folicular permite a sua maturação e posterior ovulação (SEEKALLU; TOOSI; RAWLINGS, 2009).

Com a luteólise, ocorre o decréscimo da concentração de progesterona, o que caracteriza a fase folicular, e consequente aumento da frequência dos pulsos de LH (1 a 2 pulsos por hora) (RAWLINGS; COOK, 1993), embora a amplitude dos pulsos seja diminuída se comparada com a fase luteínica. Como consequência, o aumento na frequência de pulsos de LH na fase folicular aumenta a produção de estradiol dos folículos destinados a ovular (NET et al., 2002).

O estradiol é um importante regulador do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Ele é o fator primário responsável pela indução do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. O estradiol parece alterar, pelo menos dois aspectos envolvidos com a indução deste pico. Primeiro, aumenta a síntese de receptores de GnRH na membrana dos gonadotrofos. Esta é uma resposta relativamente rápida, com aumento no número de receptores de membrana ocorrendo entre 4-6 horas em ovelhas. Segundo, o estradiol parece estimular a manutenção da secreção de GnRH pelo hipotálamo que inicia-se entre 12-15 horas após a administração de estradiol. Portanto, para induzir um pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, o estradiol primeiro aumenta a sensibilidade da glândula hipofisária ao GnRH e, quando estes gonadotrofos estão na máxima sensibilização, há drástico aumento na quantidade de GnRH sendo liberado para circulação porta-hipofisária para estimular a liberação massiva de LH, necessária para a ovulação. A duração deste aumento na secreção de GnRH induzida pelo estradiol excede a duração do pico de LH. Portanto, especula-se que o pico termina por causa de dois fatores principais: insensibilidade da glândula hipófise devido a estimulação contínua do GnRH, o que causa down-regulation dos receptores de GnRH e, por depleção do LH estocado na hipófise (NETT et al., 2002).

Além disso, já foi demonstrado que o estradiol também parece alterar a síntese e secreção de gonadotrofinas por efeitos não relacionados com a expressão de receptores de GnRH. Baratta et al. (2001) demonstraram que o estradiol alterou a secreção tanto do FSH como de LH de culturas de células da hipófise ovina, mas os efeitos nas duas gonadotrofinas foram opostos. O estradiol inibiu a secreção basal de FSH, mas estimulou a secreção basal de LH por essas células. Contudo, o aumento da concentração de estrógeno causa o feedback negativo, levando a queda da concentração de FSH durante a fase folicular (NETT et al., 1990).

Além do aumento na secreção do estrógeno, o que leva ao pico pré-ovulatório de gonadotrofinas é a diminuição da concentração de progesterona (NETT et al., 2002). Portanto, considerando-se o aumento dos títulos de estradiol, na ausência da progesterona, ocorre o aumento da frequência de pulso e consequente pico da secreção de LH e posterior ovulação (RAWLINGS; COOK, 1993).

O folículo ovulatório passa para o final do desenvolvimento largamente dependente de LH. O pico pré-ovulatório de LH causa a ovulação e maturação do óócito primário em secundário. Trabalhos recentes com ovelhas demonstraram que

a onda pré-ovulatória de LH causa secreção do ativador de plasminogênio da parede do folículo ovulatório. A plasmina ativa collagenases, que rompem a parede folicular e também causam liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), um agente apoptótico (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007). A máxima concentração pré-ovulatória de LH varia de animal para animal, mas a duração do pico é de aproximadamente 8-12 h (CUNNINGHAM, 1975; LEGAN; KARSH, 1979). O intervalo entre o início do estro e o tempo da liberação pré-ovulatória de LH varia entre e dentro de cada espécie. O intervalo relatado por Land et al. (1973) demonstra ser maior em ovelhas com alta prolificidade (18h) se comparado com ovelhas de menor prolificidade (6-7h). A ovulação propriamente dita ocorre 24 h após o início do pico de LH (CUMMING, 1971). Após a ovulação, ocorre restabelecimento do eixo com um pico de FSH precursor da primeira onda de crescimento folicular do ciclo estral subsequente (BARTLEWSKI et al., 1999).

2.3.2.1 Regulação neuro-endócrina do corpo lúteo

O período seguido do pico de LH, estro e ovulação, é o metaestro, quando a secreção de estrógeno e progesterona é baixa (BAIRD; MCNEILLY, 1981). Durante o metaestro, o pulso de frequência tônica do LH é alto (um pulso por hora), relativo ao encontrado durante a fase luteínica do ciclo estral. O folículo ovulado contém sangue coagulado e pouco tecido luteínico. Esta estrutura cresce rapidamente e se organiza, sendo denominada de corpo hemorrágico antes do dia quatro ou cinco do ciclo, quando começa a produção de progesterona e é, portanto, chamada de corpo lúteo (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007).

O LH interage com seu receptor, cujo número e concentração aumentam a partir da ovulação até alcançar seu máximo na metade da fase luteínica do ciclo estral (FITZ et al., 1982).

O LH é necessário para um normal funcionamento do CL tanto durante o início como no meio da fase luteínica do ciclo. Apesar do CL inicial parecer ser mais resistente à retirada do suporte luteotrópico, quando pulsos de LH foram inibidos por, pelo menos 48 horas, o CL foi mantido, mas a sua função secretória foi

parcialmente comprometida pelo restante do ciclo. Ao contrário, próximo ao dia 13, o CL é altamente dependente de LH, sendo que a retirada do suporte de LH resulta em rápida suspensão da secreção de progesterona (BAIRD, 1992).

Como já dito, a secreção de progesterona na ovelha é pulsátil, sendo que cada pulso é iniciado por um pulso de secreção de LH. Com isso, aumentando-se a frequência de pulso de LH durante a fase luteínica, a valores similares à fase folicular, há aumento da habilidade do corpo lúteo de secretar progesterona (SEEKALLU; TOOSI; RAWLINGS, 2009).

2.3.3 Fisiologia e composição do corpo lúteo (CL)

O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória formada pela parede do folículo de Graaf após a liberação do oócito, e por um complexo mecanismo que envolve mudanças morfológicas e bioquímicas. Esta dinâmica glândula endócrina demonstra variações de tamanho, estrutura e atividade esteroidogênica em diferentes estágios do ciclo estral e gestação (FIELDS; FIELDS, 1996).

O Corpo lúteo consiste de dois tipos de células luteínicas ou esteroidogênicas (maiores e menores) e vários outros tipos celulares como: células endoteliais, pericitos, células musculares lisas, macrófagos e leucócitos. O CL secreta progesterona como principal hormônio esteróide e pequenas quantidades de estradiol-17 β , prostaglandinas e vários hormônios peptídeos como a relaxina, ocitocina, vasopressina e inibina. Sabe-se que, além do LH, a luteinização das células da granulosa é controlada pela vascularização sanguínea, transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e vários outros fatores (SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

Poucos dias após a ovulação, o corpo lúteo formado torna-se altamente vascularizado. O aumento da vascularização, além de ser fundamental para a distribuição de esteróides para a circulação sangüínea, permite o fornecimento do substrato de colesterol, necessário para a biosíntese de progesterona (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

A taxa de crescimento vascular luteínico é maior no início do ciclo estral e, por volta da metade do ciclo, o CL maduro está altamente vascularizado. Células lúteas da granulosa, células intersticiais-tecais circundantes e a vascularização intermeiam-se para formar o CL. O que contribui para aumentar o tamanho do CL é a hipertrofia de células luteais da granulosa, hiperplasia de fibroblastos do tecido conectivo e a vascularização. O diâmetro máximo do CL é atingido com 6-9 dias após a ovulação e, sua regressão se inicia entre os dias 13 e 16 nas ovelhas (SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

A forma, tamanho e estrutura das células lúteas da granulosa variam em ovelhas. É bem aceita, a diferenciação de células da teca e granulosa em células lúteas esteroidogênicas menores e maiores. Embora, ainda seja controversa a idéia de que células luteais menores originam-se exclusivamente de células tecais e células luteais maiores originam-se exclusivamente de células da granulosa (SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

As células esteroidogênicas maiores representam aproximadamente 40% do volume total do CL, embora constituam apenas 10% do total de células. Estas células são maiores em tamanho se comparadas às outras células e tem uma excepcional capacidade esteroidogênica e de secreção de proteínas. Acredita-se que aproximadamente 80% da progesterona secretada *in vivo* pelo CL ovino sejam provenientes de células luteínicas maiores (NISWENDER et al., 1985). As células luteínicas menores constituem aproximadamente 20% do volume, e compreendem em torno de 25% do total de células. As células endoteliais ocupam aproximadamente 10% do volume e constituem 50% do total das células. E, por último, os fibroblastos ocupam aproximadamente 9% do volume luteínico e constituem em torno de 14-22% do total de células (SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

2.3.3.1 Produção de progesterona pelo corpo lúteo

A biosíntese de hormônios esteróides é modulada pela disponibilidade do colesterol e expressão de enzimas esteroidogênicas específicas. As ondas de

gonadotrofinas pré-ovulatórias iniciam mudanças distintas na expressão e regulação de enzimas esteroidogênicas, sendo o evento chave no processo de luteinização. Picos de gonadotrofinas pré-ovulatórias resultam na aquisição da enzima 3 β hidroxiesteróide-deidrogenase (3 β -HSD) pela célula da granulosa e o aumento da atividade desta enzima no CL aumenta a biosíntese de progesterona (SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

Existem diferenças na habilidade de células luteínicas menores e maiores em secretar progesterona, mas ambas as células esteroidogênicas possuem receptores para LH (WEEMS et al., 2010).

Em ovelhas, a secreção basal de progesterona *in vitro* foi menor nas células luteínicas menores se comparada às células luteínicas maiores; mas a magnitude de secreção de progesterona estimulada pelo LH foi maior nas células luteínicas menores. Pode ser que as células luteínicas maiores e menores trabalhem de forma sinérgica para produzir progesterona (SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

Em trabalhos desenvolvidos com ovelhas da raça Santa Inês, Furtado (2007) observou uma concentração média de progesterona fisiológica de $5,48 \pm 0,36$ ng/mL com pico próximo dos 7,2 ng/mL. E Paes de Barros (2010) observou concentração média de $3,8 \pm 2,69$ ng/mL de progesterona.

2.3.3.2 Luteólise

Durante a metade da fase luteínica a frequência dos pulsos endógenos de LH é marcadamente reduzida devido ao efeito dos altos níveis de progesterona. O útero começa a secretar altas quantidades de prostaglandina (PGF_{2 α}), que é distribuída pelo mecanismo de contra corrente entre a veia uterina e artéria ovariana, alcança o CL e interfere com o acoplamento do LH ao sistema adenil ciclase (WEEMS et al., 2006).

O CL é particularmente vulnerável ao efeito luteolítico da PGF_{2 α} durante os períodos entre os pulsos de LH. Quando a concentração de LH aumenta durante o pulso, ocorre um temporário aumento na secreção de progesterona devido a um aumento na concentração intracelular de AMPc. Em dado momento, a secreção de

PGF_{2α} torna-se suficiente para desacoplar o sistema de ativação do receptor de LH e a regressão luteínica ocorre. A PGF_{2α} inicia a luteólise pela ligação com seu receptor nas células luteais em torno do dia 13 em ovinos (WEEMS et al., 2006).

Pesquisas recentes divulgaram que o neuropeptídeo Y (NPY) estimulou a liberação de ocitocina das células luteais maiores e facilitou o concomitante aumento na circulação ovariana, dois eventos fisiológicos chaves que também ocorrem na luteólise (KEATOR et al., 2010).

Prostaglandinas (10-15 mg IM) têm sido utilizadas para causar a luteólise e sincronização do estro em ovelhas. O CL só é responsivo a partir do dia quatro do ciclo estral. O estro ocorre em média 40 h após a sua administração (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007).

2.3.4 Reconhecimento materno e fisiologia da gestação

No dia 12 após o estro, em ovelhas, é necessária a presença do concepto, no corno adjacente ao ovário com corpo lúteo, para evitar a regressão luteínica e permitir o estabelecimento da gestação. Segundo Weems et al. (2007), a manutenção do CL não é devido à redução da produção uterina da PGF_{2α}, mas sim devido à redução da sensibilidade do CL à PGF_{2α}, através da PGE₁ e/ou PGE₂. Nos dias 12 e 13 após o estro, dosagens de PGF_{2α}, que iniciam a regressão luteínica e retorno ao estro em ovelhas não-gestantes, falham em causar regressão luteal em ovelhas gestantes (SILVIA; NISWENDER, 1984). Portanto, a presença do concepto e a produção de luteotrofinas pelo CL podem reduzir a sensibilidade do CL à PGF_{2α} no início da fase luteínica (WEEMS et al., 2007).

O interferon-tau é a proteína embrionária responsável pelo reconhecimento materno da gestação em ovinos. Foi observado que ela aumenta a secreção endometrial de PGE pela inibição da conversão da PGE₂ em PGF_{2α} (ASSELIN; FORTIER, 2000). Outros pesquisadores observaram que o interferon-tau age no endométrio inibindo o desenvolvimento do mecanismo luteolítico, pela inibição da expressão do receptor de estrógeno, e portanto, da produção de PGF_{2α} (SPENCER et al., 2007).

Foi observado que o tecido luteal de uma ovelha gestante secreta PGE até o dia 50 de gestação (WEEMS et al., 2010).

A secreção de progesterona durante a gestação em ovelhas é proveniente do corpo lúteo e placenta (WEEMS, et al., 1992). Portanto, na ovelha a gestação é corpo lúteo dependente até o 50º dia de gestação, pois após este período, a placenta assume o papel principal como fonte secretora de progesterona. Com isso, a concentração de progesterona aumenta a partir do dia 55; quando a placenta contribui com a secreção de progesterona, alcança um pico em torno do dia 130 e declina antes do parto (RICKETS; FLINT, 1980). A ovariectomia antes do dia 55 de gestação em ovelhas causa aborto devido à insuficiente produção de progesterona pela placenta (WEEMS, et al., 2007).

Decorridas 24, 49 e 72 horas após a ovulação, o zigoto apresenta, respectivamente, 2, 4 e 16 células, sendo denominada mórula quando atinge este último estágio de desenvolvimento. O tempo de permanência desta estrutura embrionária na tuba uterina é de aproximadamente 3 dias. Depois de 4 a 5 dias da ovulação, a mórula penetra na cavidade uterina e no 6º ou 7º dia, o embrião já está no estágio de blastocisto, eclode depois de ocorrer fragmentação da zona pelúcida. No dia 11 o blastocisto se desenvolve em uma forma tubular e com 12 dias inicia o processo de alongação, alcançando 10 cm ou mais de comprimento no dia 14 de gestação (SPENCER et al., 2007). O período embrionário corresponde do 11º ao 34º dia e caracteriza-se por um rápido crescimento e diferenciação dos principais tecidos, órgãos e sistemas, estabelecendo as características da forma externa do corpo. A placentação é do tipo sinepteliocorial e tem início no 15º dia da gestação (SONG et al., 2007).

Em ovelhas a taxa de sobrevivência embrionária está em função da taxa de ovulação, ou seja, há declínio com o aumento do número de ovulações. A percentagem de perdas embrionárias/fetais estimadas são de 12%, 18% e 26% para ovelhas com 1, 2 ou 3 ovulações, respectivamente. Os principais fatores implicados nas perdas embrionárias/fetais são categorizados em: genéticos, fisiológicos, endócrinos e de origem ambiental como manejo e nutrição (DISKIN; MORRIS, 2008).

A duração da gestação em qualquer mamífero é, geralmente, relacionada com alguns fatores como número de fetos, tamanho da cria, tamanho da fêmea, constituição genética, condições ambientais, espécie e raça, todavia, de um modo

geral, dura em torno de cinco meses, variando de 144 a 151 dias, sendo de 144 a 147 dias nas raças de carne e de 144 a 152 dias nas raças lanadas (DISKIN, MORRIS, 2008).

O puerpério, fase que segue ao parto, é caracterizado como sendo a fase de involução do útero, restabelecimento da atividade funcional do endométrio e retorno da atividade ovariana, embora o retorno ao estro seja afetado pela estação do ano naquelas raças de reprodução estacional. Em ovelhas, o período para a completa de involução uterina é de aproximadamente 32 dias, mas pode variar de acordo com a raça e estação (HAYDER; ALI, 2008).

2.4 ULTRASSONOGRAFIA E DINÂMICA FOLICULAR

O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos, que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário é conhecido como: dinâmica folicular ovariana. O crescimento folicular envolve o desenvolvimento sincrônico de um grupo de folículos denominado: onda folicular (GINTHER, KNOPF e KASTELIC, 1989).

Os primeiros estudos para compreender as mudanças que ocorrem nos ovários dos ovinos foram realizados por laparotomias exploratórias, laparoscopias seriadas ou através de materiais obtidos em frigoríficos. Apenas nos anos 90, com a incorporação da ultrassonografia retal, que ocorreram grandes avanços no conhecimento da fisiologia reprodutiva desta espécie. Roelofs et al. (2004) em seu trabalho com vacas concluíram que exames repetidos de ultrassonografia não alteram o comportamento de estro ou o perfil hormonal peri-ovulatório.

A ultrassonografia retal é uma técnica não-invasiva, que tem sido muito utilizada para o freqüente monitoramento de mudanças morfológicas nos órgãos reprodutivos de animais conscientes e com o mínimo estresse (WURST, DIXON e INSKEEP, 2007). Tem boa aplicabilidade e com alta acurácia no diagnóstico de gestação em ovinos (DIAS et al., 2009), mas especialmente no que se refere à dinâmica folicular, existe a necessidade de um bom treinamento, pois a anatomia da

espécie dificulta o exame, limitando apenas a entrada do transdutor no reto da ovelha, sem o auxílio das mãos para direcioná-lo próximo aos ovários.

Com a ultrassonografia, percebeu-se que existe um padrão de ondas no crescimento e regressão de folículos antrais ovarianos de ovinos, tanto durante a estação de acasalamento (SCHRICK et al., 1993; GINTHER, KOT e WILTBANK, 1995; BARTLEWSKI et al., 1999; EVANS et al., 2000; TOOSI et al., 2009) como na fase de anestro (SOUZA; CAMPBELL; BAIRD, 1996; BARTLEWSKI et al., 1998).

Durante o ciclo ovulatório podem ocorrer de 2 a 4 ondas foliculares, sendo o mais freqüente, o ciclo com 3 ondas. O Comprimento do ciclo estral em ovinos possui média de 17 dias, sendo que este comprimento é similar entre ciclos estrais com 3 ou 4 ondas foliculares, assim como o diâmetro máximo dos folículos e a produção de estradiol (SEEKALLU, et al., 2010).

Após a emergência da onda, usualmente 1, 2 ou até 3 folículos continuam seu crescimento de um pool de folículos menores (2 a 3 mm de diâmetro); alcançam um diâmetro ≥ 5 mm (folículos maiores), enquanto que os demais folículos médios (4-5mm) e pequenos entram em atresia. O maior folículo ovula ou regride e uma nova onda emerge com um intervalo de aproximadamente 5 dias (3-7dias) (MENCHACA et al., 2010).

Em ovelhas, é comum ocorrer mais de uma ovulação, sendo que o número irá variar de acordo com a raça, ambiente e manejo. A Santa Inês, também com ciclo estral médio de 17 dias (FURTADO, 2007) é considerada uma raça de razoável prolificidade, com uma taxa de 30% de duplas ovulações e intervalo médio de 16 h (12 a 24) entre as ovulações (PAES DE BARROS, 2010).

Menchaca e Rubianes (2004), em um trabalho de revisão, reuniram as características mais freqüentes da dinâmica folicular ovina a seguir: 1) pelo menos um folículo atinge o diâmetro ≥ 5 mm por onda; 2) o maior folículo de cada onda cresce por 5-7 dias, com uma taxa de crescimento por volta de 1mm/dia; 3) o diâmetro máximo do maior folículo difere entre as ondas; 4) à medida que a fase luteal avança, a concentração plasmática de progesterona eleva-se, o “turnover” folicular (renovação folicular) é facilitado e os intervalos entre as ondas tornam-se menores do que durante a fase luteínica inicial; 5) durante as fases luteínicas intermediária e final, os folículos que não crescem acima de 4mm não fazem parte do fenômeno da onda. Sugere-se neste caso que estes folículos representam um pool de folículos em dinâmica subjacente; 6) os maiores folículos, presentes nos

ovários no dia da luteólise, são aqueles que irão ovular; 7) na maioria dos ciclos com duas ovulações, os folículos ovulatórios emergem como parte da mesma onda folicular, mas em alguns casos eles podem emergir em ondas foliculares diferentes; 8) as duplas ovulações ocorrem com um intervalo de 24 horas entre as mesmas.

Bartlewski et al. (1999) relataram que os folículos antrais que emergem no final do ciclo estral e estão destinados a ovular não necessariamente crescem além dos folículos anovulatórios das ondas anteriores, nem produzem mais estrógeno.

No estudo de Leyva; Buckrell; Walton (1998) com ovelhas da raça Suffolk observaram que a maioria das ovelhas exibiram 3 ondas foliculares com ciclos estrais de 16 dias. Os dias de emergência foram: Onda 1: -1 a 3; Onda 2: 4 a 7; Onda 3: 8 a 12; Onda 4: 12 a 14. O diâmetro do maior folículo da onda 2 (5.4 mm) foi menor ($P < 0,01$) do que o da onda 1 (6.1 mm) e da onda 3 (6.3 mm). A emergência folicular ocorreu em média nos dias 0,4; 5,5 e 11,1 do ciclo para as ondas 1, 2 e 3, respectivamente. O intervalo de emergência de ondas foi similar entre as ondas, com uma média de 5,3 dias. O maior folículo das ondas 1 e 3 demorou mais tempo (4,1 e 4,6 dias, respectivamente) para alcançar o diâmetro máximo do que os da onda 2 (3,1 dias), embora a taxa de crescimento tenha sido similar entre as ondas com média de $0,8 \pm 0,1$ mm/dia.

Diferente dos bovinos, o crescimento do maior folículo antral nas ovelhas não reflete em nenhuma mudança no número total de pequenos folículos (1-3mm) no ovário, exceto por um pequeno aumento próximo à ovulação (DUGGAVATHI; BARTLEWSKI; BARRETT, 2001).

TOOSI et al. (2009) avaliaram a dinâmica folicular e as características ultrassonográficas após o período de sincronização em ovelhas cíclicas da raça Western White face. O protocolo utilizado foi o de 14 dias com implante de medroxiprogesterona (MAP). Taxa de crescimento da onda ovulatória foi de 0,9 mm/dia. O diâmetro folicular máximo da onda ovulatória foi de 5,7 mm. O dia de emergência após a ovulação anterior (dia 0) foi 4,5 dias para a onda 2; 8,1 dias para a onda 3 e de 11,6 dias para a onda ovulatória. A concentração média de progesterona aumentou gradualmente entre os dias 2 e 11 após a ovulação. A concentração média atingiu um pico de 2,2 ng/ml no dia 12 após a ovulação.

Em relação aos ovários, segundo Reyna (2007) não existe diferenças entre os ovários (direito e esquerdo) no diâmetro inicial e final e na taxa de crescimento do folículo ovulatório, dentro ou fora da estação reprodutiva de ovelhas. Ali, Derar e

Hussein (2006) também não observaram diferença no número de ovulações entre os ovários: esquerdo e direito. Já Shabankareh; Habibizad; Torki (2009) observaram maior taxa de ovulação no ovário direito se comparado com o esquerdo. A razão para esta discrepância de resultados não está clara. Contudo, é possível que fatores parácrinos e autócrinos e diferenças na vasculatura e drenagem linfática entre os ovários tenham contribuído para a variação de resultados (SHABANKAREH; HABIBIZAD; TORKI, 2009).

2.4.1 Dominância folicular

Dominância é o processo pelo qual um folículo antral em crescimento numa onda ultrapassa os outros folículos na taxa de crescimento e diâmetro. Além disso, suprime o crescimento de outros folículos subordinados, provavelmente através de produtos secretórios foliculares (GINTHER et al., 1996).

Em mamíferos, o mecanismo em que um ou mais folículos continuam seu desenvolvimento e outros regredem ainda não está completamente elucidado. Provavelmente, isto ocorre como resultado da integração entre sinais endócrinos, autócrinos e parácrinos, que afetam a maquinaria de sobrevivência celular. O que já foi observado é que folículos dominantes possuem maior quantidade de proteínas kinases (Akt and Erk 1/Erk) do que os subordinados, sendo que estas proteínas podem ter um papel importante no mecanismo de seleção folicular (EVANS; MARTIN, 2000).

Em bovinos, os dois ovários agem como uma unidade única, ou seja, cada onda folicular de ambos os folículos respondem em concordância. O folículo dominante suprime os folículos subordinados e uma nova onda folicular. Portanto, apenas um folículo, do par de ovários, é selecionado para se tornar dominante. O lado em que o folículo se desenvolve é aleatório, e o folículo dominante pode residir no mesmo ou no ovário contra-lateral do maior folículo subordinado. O lado do CL ou do folículo dominante da onda anterior também não tem efeito no lado do folículo ovulatório (ADAMS et al., 2008). Além disso, a emergência de uma nova onda folicular e seleção do folículo dominante estão temporalmente associados com o

aumento e decréscimo das concentrações de FSH (ADAMS et al., 1992). Os produtos foliculares, especialmente aqueles advindos do folículo dominante, são responsáveis por impedir a liberação de FSH e, portanto, a emergência da próxima onda folicular. Receptores para FSH estão presentes somente nas células da granulosa, enquanto que receptores para LH estão localizados tanto nas células da teca quanto da granulosa na parede dos folículos antrais. O folículo dominante adquire mais receptores de LH nas células da granulosa se comparado aos folículos subordinados e com isto, são capazes de trocar de dependência gonadotrófica para LH durante o nadir de FSH e continuar a crescer enquanto que os subordinados regridem (ADAMS et al., 2008).

Em ovinos, existem evidências de dominância folicular (REYNA et al., 2007), mas que diferem em alguns pontos do que é visto em bovinos, indicando que a dominância folicular parece atenuada nessa espécie (MENCHACA, et al., 2010). O que, segundo RAVINDRA et al (1994) é lógico, uma vez que as ovelhas são animais prolíficos.

A habilidade de grandes folículos em bloquear a emergência de uma nova onda folicular foi demonstrada durante a onda ovulatória (RAVINDRA et al., 1994), primeiras ondas do ciclo (VIÑOLES et al., 1999; EVANS et al., 2002) e durante a segunda onda (SEEKALLU; TOOSI; RAWLINGS, 2009) em ovelhas.

Em seu trabalho, VIÑOLES et al. (1999) concluíram que existe dominância na primeira onda folicular porque foi observada divergência de crescimento durante a primeira onda entre o maior folículo e o segundo maior folículo. Além disso, o número total de folículos maiores que 2 mm presentes no momento da emergência da onda 1 declinou e permaneceu baixo durante a fase de crescimento do maior folículo. Em contraste, na onda 2 não foi encontrado nem divergência entre os perfis de crescimento dos dois maiores folículos, nem mudanças no número total de folículos, o que sugere que a dominância não está presente durante a segunda onda folicular.

A indução de um ambiente com baixa progesterona resultou em aumento do tempo de vida e diâmetro do folículo dominante da onda 1 em 8 das 11 ovelhas tratadas (VIÑOLES et al., 1999). Nestes animais, o número total de folículos permaneceu baixo, sugerindo que o folículo exerce dominância e inibe a emergência de uma segunda onda folicular. Isto está de acordo com dados de bovinos em que níveis subluteais de progesterona prolongam o crescimento folicular pelo aumento

da frequência de pulso de LH (SIROIS; FORTUNE, 1990). Este fenômeno está associado com o aumento da quantidade de 17β -estradiol produzido por este folículo (STOCK, 1993). Portanto, Viñoles et al. (1999) confirma a idéia de dominância do maior folículo da primeira onda, e de que concentrações subluteais de progesterona prolongam o tempo de vida e a dominância desse folículo.

Outro dado que evidencia a dominância é o fato de que quando o tratamento superovulatório é iniciado na ausência de folículos maiores, há melhor recrutamento folicular, taxa de ovulação e qualidade embrionária em ovelhas (MENCHACA et al., 2010).

Contreras-Solis et al. (2008) afirmam a existência de ondas maiores com folículos que atingem a dominância (durante o início da fase luteínica e da fase folicular) e ondas menores de desenvolvimento folicular sem a clara dominância de um folículo (durante meio da fase luteínica). A ausência de dominância durante a fase luteínica do ciclo estral ovino pode ser devido ao efeito supressivo da progesterona do CL (ADAMS, 1999; CONTRERAS-SOLIS et al., 2008).

Contreras-Solis et al. (2008) e Shabankareh et al. (2010) ainda afirmam que existe não somente um efeito sistêmico, mas também intraovariano do CL na dinâmica folicular. Isto devido a um decréscimo no número de folículos maiores crescendo no ovário ipsilateral ao CL (BARTLEWSKI, BEARD e RAWLINGS, 2001). Este resultado, primeiro relatado em bovinos (THATCHER et al., 1991) é similar aos achados clínicos em humanos. Em humanos, folículos dominantes presentes no ovário contra-lateral ao ovário onde ocorreu a ovulação são mais saudáveis do que os folículos ipsilaterais, o que levou a uma melhora na qualidade pré-embrionária nos ciclos estrais em que os oócitos foram captados para FIV (FUKUDA et al., 1996).

Portanto, parece que em ovelhas, assim como em cabras (ALVES et al., 2005), existe uma dominância folicular em determinadas ondas do ciclo e esta dominância parece se concentrar na primeira onda e na onda ovulatória.

2.5 PROTOCOLOS HORMONAIS

Este capítulo foi dividido em tópicos e abordará os seguintes temas: principais hormônios e dispositivos utilizados, período de protocolo e justificativa do protocolo hormonal escolhido.

2.5.1 Principais hormônios e dispositivos utilizados

Dentro dos procedimentos de manejo reprodutivo, a sincronização do estro através da utilização de protocolos hormonais permite maior proporção de ovelhas gestantes em curto espaço de tempo e o consequente nascimento uniforme de cordeiros na época desejada.

Esta sincronização pode ser obtida com o uso de prostaglandina em dose única, ou em duas doses intervaladas de dez dias durante a estação de acasalamento (FONSECA; BRUSCHI, 2006) ou ainda, de forma mais eficiente, por uma combinação dos hormônios prostaglandina e progesterona (ou progestágenos), além do uso ou não do eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) (MENCHACA; RUBIANES, 2004).

A eficácia da aplicação da prostaglandina depende da funcionalidade do corpo lúteo que responde melhor a partir do 5º dia do ciclo estral. O intervalo entre a aplicação e a observação do estro é variável, entre 24 e 72 horas, devido à fase de desenvolvimento folicular no momento da aplicação (VIÑOLES, et al., 2000). Portanto, para conferir melhor sincronização do estro o ideal seria associar a prostaglandina aos progestágenos, que podem ser administrados por vários métodos, vias e doses.

Quanto à estrutura e tipo de progesterona ou progestágeno, os dispositivos mais utilizados são em forma de implantes plásticos cobertos por fina camada de silicone e impregnados com progesterona (CIDR®-Pfizer; WHEATON et al., 1993); implantes auriculares de norgestomet (Crestar® - Intervet) ou em esponjas e

impregnados com fluorgestona (FGA) (GASTON-PARRY et al., 1988) ou acetato de medroxiprogesterona (MAP). No caso das esponjas, a principal vantagem é o preço, mas tem como desvantagem a dificuldade de manejo, devido aos grandes índices de vaginite e aderência. Já os dispositivos em silicone são fáceis de aplicar e retirar da vagina, seguros e higiênicos, porém, de maior custo ao consumidor (PAES DE BARROS, 2010).

Sabe-se que a concentração adequada de progesterona sistêmica é essencial para o desenvolvimento e função dos folículos ovarianos. O objetivo da utilização de progestágenos ou progesterona é a diminuição da secreção de LH, o que bloqueia o estro, o pico de LH e a ovulação, até que a esponja seja retirada. A manutenção de altas concentrações de progesterona e, consequente baixa frequência de LH, também aumentam o turnover folicular; portanto, ao final do tratamento, espera-se que os folículos estejam em fase de crescimento e, competentes para liberar oócitos viáveis.

Já foi citado que a liberação de progesterona das esponjas, algumas vezes seja abaixo do ideal, particularmente no final de protocolos longos. O efeito desta baixa concentração de progesterona no caráter reprodutivo tem sido relatado tanto em bovinos (AUSTIN et al., 1999) como em ovinos (JOHNSON et al., 1996; VIÑALES, et al., 1999). Acredita-se que em animais com baixa concentração sistêmica de progesterona, o LH não é adequadamente bloqueado, podendo levar ao desenvolvimento anormal de folículos, conhecidos como folículos persistentes, que aumentam a produção de estradiol e decrescem a fertilidade (LETELIER et al., 2009). Embora, Evans et al. (2001) conteste a ocorrência desta baixa fertilidade.

O estudo de Letelier et al. (2010) que será citado no tópico abaixo, evidencia deficiências no crescimento e funcionalidade de tecidos luteais de ovelhas tratadas com progestágeno, comprometendo a fertilidade dos ciclos reprodutivos assistidos.

Por isso a importância de estudos com novos dispositivos eficazes e de baixo custo. Recentemente PAES DE BARROS (2010) avaliou a eficácia de um novo dispositivo de silicone impregnado com progesterona (Primer-PR® - Tecnopec). Este dispositivo se mostrou eficaz, pois causou o aumento e manutenção de altas concentrações de progesterona no período certo, o que permitiu a regressão dos folículos e a sincronização da emergência da onda ovulatória próximo à retirada do dispositivo, sem a ocorrência de aderência ou vaginites. Em estudo comercial sobre a fabricação de dispositivos de silicone já conhecidos no mercado, constatou-se que

o custo correspondente às frações alma plástica, membrana de silicone e progesterona representam, respectivamente, 10%; 64% e 26% (VALENTIM, 2004). Portanto, além de eficaz, como este novo dispositivo dispensa a alma plástica rígida em sua estrutura, terá menor custo de produção, o que pode refletir em menor gasto para o produtor.

2.5.2 Período do protocolo

Em programas reprodutivos tradicionais, a progesterona e seus análogos são utilizados por períodos de 12 a 14 dias, equivalendo ao tempo de vida de um corpo lúteo. Estes protocolos se mostram eficientes na sincronização do estro, porém com resultados de fertilidade variáveis (AINSWORTH; WOLYNETZ, 1982; LEYVA et al., 1998; VIÑOLES, et al., 2000; BOSCOS et al., 2002). Segundo Menchaca e Rubianes (2004), os protocolos tradicionais são antigos e não consideram os conhecimentos atuais da dinâmica folicular. Estes autores defendem o uso de protocolos mais curtos entre 5 a 7 dias. Alguns estudos relatam a mesma eficiência entre protocolos curtos e longos (UNGERFELD; RUBIANES, 1999; VIÑOLES, et al., 2001), mas na literatura ainda há predominância dos protocolos mais longos.

Recentemente, Biehl (2009) estudou o protocolo de 7 dias na raça Santa Inês. O trabalho foi dividido em 3 experimentos. No primeiro experimento o tratamento hormonal foi de 7 dias com CIDR e no momento da retirada aplicação de 300 UI de eCG e PGF_{2α}. A IA foi realizada 55 h após a retirada do CIDR com sêmen refrigerado pelo método transcervical. Como resultado a taxa de gestação foi de 34% e a manifestação do estro ocorreu em 50% dos animais com média de 44 h para seu início. No segundo experimento foram comparados os protocolos de 7 e 11 dias com CIDR novo e usado, sendo a aplicação do eCG e PGF_{2α} no mesmo momento do experimento anterior. A IATF foi realizada às 49 h também com sêmen refrigerado e pelo método transcervical. Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao início da manifestação de estro com média de 35 h e 38 h nos protocolos de 7 e 11 dias, respectivamente. A taxa de gestação também não foi diferente com média de 28,6%. No terceiro experimento foi escolhido o protocolo de 11 dias com o

mesmo procedimento de aplicação do eCG e PGF dos anteriores. Como resultado, a manifestação do estro foi, em média, próxima de 30 h, a taxa de gestação foi maior no grupo com monta natural (66%) se comparado aos grupos: IATF com sêmen fresco por laparoscopia às 48 h (43%), IATF associado à aplicação de GnRH (45%) e IA com sêmen fresco no esquema AM/PM 12 h após a manifestação do estro (54%). De acordo com os resultados do segundo experimento, não houve diferença na taxa de gestação entre os protocolos de 7 e 11 dias.

Contudo o nosso grupo de pesquisa optou por iniciar os estudos com um protocolo intermediário, no caso o de 9 dias. De início esta opção se baseou em informações de resultados de campo favoráveis; em acreditar que este período também se adequa aos conhecimentos recentes da dinâmica folicular de ovinos, como a duração da onda folicular com média de 5 dias e na importância de um período ideal para o priming de progesterona ser efetivo. Com isto, o protocolo de 9 dias permite que as ovelhas tenham a regressão folicular em até 4 dias, turnover folicular pela alta concentração de progesterona e desenvolvimento de uma nova onda fértil próximo à retirada do dispositivo, como se confirmou na tese de Paes de Barros (2010). Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de continuar os estudos deste protocolo de 9 dias, com a utilização do novo dispositivo de progesterona, além da usual aplicação de PGF_{2α} e eCG (PAES DE BARROS, 2010). Soma-se ao protocolo avaliado, a aplicação de um indutor (hCG) para sincronizar melhor a ovulação, pois apesar do protocolo proposto por Paes de Barros (2010) ter sido eficiente em sincronizar a emergência da onda ovulatória, houve grande dispersão entre as ovulações, o que inviabilizaria a utilização deste protocolo em programas de IATF com sêmen refrigerado ou descongelado, pelo seu menor período fértil (DOMINGUEZ et al., 2008).

2.6 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG)

O eCG é uma glicoproteína secretada pelas células trofoblásticas na égua entre 36 e 120 dias de gestação. Quando utilizado em outras espécies, este hormônio exibe pronunciada atividade FSH (80%), além da atividade LH (20%)

(BARRETT et al., 2004). Caracteriza-se por ser um hormônio bastante glicolizado, com grande quantidade de ácido siálico em sua molécula, o que aumenta a meia-vida (63 h) do hormônio *in vivo*. A dupla atividade do eCG, sua longa meia-vida e sua disponibilidade em grande quantidade faz desta gonadotrofina um hormônio exógeno conveniente para tratamento de sincronização do estro e ovulação em pequenos ruminantes (HERVÉ et al., 2004).

Segundo Driancourt e Fry (1992), o eCG aumenta a taxa de ovulação nas ovelhas através do recrutamento de folículos ovarianos menores, aumenta a taxa de crescimento de folículos antrais e altera a razão e tamanho de classes de folículos no momento do estro. Como desvantagem, já foi observado que o eCG causa ativação precoce do oócito (MOOR; OSBORN; CROSBY, 1985).

Quando empregados programas de inseminação artificial em tempo fixo, são necessários hormônios adicionais para garantir uma menor possibilidade de dispersão das ovulações entre as ovelhas (ZELEKE et al., 2005). O protocolo mais utilizado para sincronização do estro para IATF inclui o uso de progestágeno associado ao eCG. Altas taxas de gestação são alcançadas utilizando este tratamento, mas existe variação na resposta entre os rebanhos no momento de ovulação (REYNA et al., 2007). Segundo Menegatos et al (2003) a aplicação do eCG após a retirada do implante de progesterona encurta o intervalo entre retirada e início do estro.

Rodrigues (2004) em seu trabalho realizado em Belém (Brasil) conclui que a utilização da eCG associada ao progestágeno é necessária para uma eficiente indução e sincronização do estro em ovelhas das raças Morada Nova e Santa Inês e que as doses de 200, 300 e 400 UI de eCG permitem taxas de ovulações satisfatórias, sem riscos de uma superovulação.

Baixas doses de eCG podem ou não causar pequeno aumento na taxa de ovulação em ovelhas cíclicas. Baixas doses de eCG aumentam de forma significativa a estrogenicidade de folículos maiores. Este efeito é mais pronunciado no anestro se comparado com ovelhas cíclicas, uma vez que no anestro as ovelhas são menos estrogênicas. Ovelhas cíclicas tratadas com eCG possuem elevada concentração de progesterona após o tratamento se comparado ao controle. Este aumento na taxa de progesterona pode aumentar as taxas de prenhez (BARRETT et al., 2004).

Luther et al. (2007) também concluíram que para se obter altas taxas de sincronização e de gestação após a inseminação artificial por laparoscopia com

sêmen congelado em ovelhas, deve-se utilizar protocolos que incluam progestágenos associados com injeção de eCG.

Em ovelhas cíclicas, o eCG administrado após o MAP afeta primariamente os folículos antrais que estavam na fase estática de seu desenvolvimento (WU et al., 2009).

Algumas pesquisas retratam que a administração do eCG devido à sua longa meia-vida pode levar ao desenvolvimento de grandes folículos anovulatórios estrogênicos que, em parte, influenciam negativamente no início do desenvolvimento embrionário e o transporte na tuba uterina (HUSEIN; ABABNEH, 2008).

Outra desvantagem da utilização do eCG é em relação ao seu efeito imunogênico (MAUREL et al., 2003) mais expressivo em cabras (ROY et al., 1999) mas também relatado em ovelhas (BODIN et al., 1997). A principal consequência é que animais com grandes quantidades de anticorpos antes de uma próxima exposição à gonadotrofina estão associados com atraso ou supressão do estro e pico de LH (DRION et al., 2002) e isto pode afetar a fertilidade principalmente em relação aos protocolos de superovulação (FORCADA et al., 2011).

2.7 GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

Em humanos, os primeiros estágios da gestação são mantidos pelo hormônio: gonadotrofina coriônica humana (hCG) produzida pelo concepto. A estrutura 3D da hCG foi descoberta em 1994 por Laphorn. O hCG é um membro dos hormônios glicoprotéicos que são compostos de uma subunidade α e uma subunidade β específica, associados de forma não-covalente para formar um heterodímero. A subunidade α da hCG, que é comum aos hormônios glicoprotéicos: TSH, FSH e LH, consiste de uma cadeia polipeptídica com 92 resíduos de amino-ácidos contendo oligossacarídeos acoplados ao N. Já a subunidade β específica, consiste de 145 resíduos com dois oligossacarídeos ligados ao N e 4 ligados ao Oxigênio (LAPTHORN et al., 1994; HERSHMAN, 2004).

Os receptores dos hormônios glicoproteicos são membros da grande superfamília de receptores transmembrânicos, acoplados à proteína-G. Eles

compartilham alto grau de homologia (aproximadamente 70%) no seu domínio transmembrânico. A principal diferença é encontrada no grande domínio amino-terminal extracelular envolvido na ligação do hormônio. Embora seja necessário o heterodímero para se ligar ao receptor, é a subunidade β que determina a atividade específica de cada hormônio.

Os hormônios glicoproteicos são todos glicosilizados com complexos carboidratos ligados ao N, o que confere a heterogeneidade de determinado hormônio. Esta heterogeneidade de carboidratos é importante porque impede a cristalização do hormônio protéico. Neste contexto, a hCG é um hormônio fortemente glicosilizado (aproximadamente 34% do peso da proteína), com quatro carboidratos adicionais ligados ao Oxigênio na subunidade β , o que lhe confere alto peso molecular de 36.700 (LAPTHORN et al., 1994).

A taxa de metabolização plasmática do LH e da hCG em humanos tem demonstrado duas fases que são diferentes entre LH e hCG. Durante a fase inicial rápida, o LH tem meia-vida de 21 minutos, enquanto que a hCG tem meia-vida de 5 a 9 horas. Durante a segunda fase de baixa metabolização, o LH tem meia-vida de aproximadamente 4 horas, enquanto que a hCG tem meia-vida de 1 a 1,3 dias. Portanto, a hCG é caracterizada pela sua extensa meia-vida plasmática comparada ao LH (YEN et al., 1968). Esta diferença é devido à grande quantidade de ácido siálico na molécula da hCG comparado com o LH o que reduz a captação hepática e portanto aumenta a meia-vida plasmática (HERSHMAN, 2004).

No experimento de Schmitt et al. (1996) em que as novilhas receberam no dia 5 do ciclo estral 1.000 UI IV e 2.000 UI IM, a concentração plasmática de hCG aumentou marcadamente por 30 horas após a administração e às 66 horas ainda não havia retornado à concentração basal. Portanto, assim como em humanos, em bovinos também ocorre lenta metabolização. Além disso, em humanos, injeções intramusculares de hCG possibilita uma meia-vida mais longa quando comparada com a via intravenosa de administração (RIZKALLAH; GURPIDE; VAN DE WIELE, 1969).

Por décadas, a hCG utilizada para ciclos de FIV era derivada de urina humana. Hoje, a hCG, assim como a maioria das proteínas, é produzido pela tecnologia do DNA recombinante. Frequentemente, as proteínas recombinantes são produzidas de forma mais eficiente, em maior quantidade e menor custo. Outra vantagem é a menor exposição às doenças de animais e humanos. Além disso, a

tecnologia recombinante permite a modificação de uma proteína ou a seleção de um gene em particular para melhorar sua função ou especificidade (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Estudos clínicos demonstraram que as duas preparações de hCG, urinário e recombinante, trazem resultados similares (AL-INANY et al., 2005; KOVACS et al., 2008).

Existe alto grau de similaridade na sequência dos primeiros 114 aminoácidos entre a hCG e os outros hormônios glicoproteicos (LH 85%; FSH 36%; TSH 46%). A homologia entre a hCG e o LH reflete uma função biológica comum, já que ambas proteínas se ligam ao mesmo receptor (LAPTHORN et al., 1994; HERSHMAN, 2004). Esta similaridade de funções vem sendo muito estudada na área reprodutiva.

Aproximadamente 30 anos atrás, foi descoberta a presença do receptor LH/hCG em células da granulosa e células luteais no ovário (ZIECIK et al., 2007). Desde então, o uso da hCG tem sido um método viável para induzir a ovulação e promover a formação de corpos lúteos acessórios; em vacas (SILVA; COSTA, 2005) e eqüinos (GINTHER et al., 2009) como também aumentou a concentração plasmática de progesterona em cabras, vacas (SILVA; COSTA, 2005; DE RENSIS et al., 2008), éguas, ovelhas (NEPHEW, et al., 1994; NEPHEW, et al., 2006; KHAN; BECK; KHALID, 2007) e búfalas (CAMPANILE et al., 2008); além de evitar a regressão prematura do CL, e permitir o prolongamento da fase luteal (THATCHER et al., 2001). Embora ainda existam resultados controversos quanto ao efeito do tratamento sobre a taxa de gestação (FONSECA, 2005; MACHADO, 2005; SILVA; COSTA, 2005; KHAN, et al., 2007), alguns estudos observaram que o tratamento com hCG promove aumento na taxa de gestação em propriedades com baixas taxas de fertilidade (GOMEZ-BRUNET et al., 2007) ou durante o período quente do ano em vacas leiteiras, em que a perda embrionária tende a ser maior (DE RENSIS et al., 2008) ou ainda, em borregas, onde a administração de hCG no momento da IA aumentou o crescimento do conceito, placentação e número de cordeiros nascidos (KHAN, et al., 2003).

Nephew et al. (1994) avaliaram a aplicação de hCG após a ovulação em ovelhas. Foram administrados 100 UI de hCG no dia 11.5 do ciclo. A hCG aumentou a concentração de progesterona e o peso do CL. Os conceitos recuperados das ovelhas tratadas com hCG foram maiores e estavam associados com lavados contendo mais proteínas do que o grupo controle.

Estudos em que a hCG foi administrada no momento da inseminação artificial aumentaram o número de cordeiros nascidos por ovelha (ZAMIRI; HOSSEINI, 1998; KHAN et al., 2003) mas não contribuíram para o aumento na concentração de progesterona. Contrariamente, dados do trabalho de Gómez-Brunet et al. (2007) demonstraram que a administração de 500 UI de hCG no momento da inseminação intracervical não modificou a taxa de gestação, a prolificidade e a taxa de progesterona das ovelhas. Estes resultados estão de acordo com um estudo com bovinos (SIANANGAMA; RAJAMAHENDRAN, 1992), revelando que a capacidade da hCG de promover aumento da síntese de progesterona pelo corpo lúteo ou aumento da fertilidade, varia de acordo com o estágio do ciclo estral.

O tratamento com hCG também pode aumentar a circulação sanguínea no ovário e corpo lúteo (NISWENDER; REIMERS; NETT, 1976; WULL et al., 2001) devido à existência de receptores LH/hCG tanto em vasos sanguíneos de tecidos alvo como no próprio CL (RAO; LEI, 2007; ZIECIK et al., 2007). Tratamento com hCG purificado em veias uterinas e umbilicais isoladas demonstraram aumento de eicosanóides vasodilatadores e diminuição de eicosanóides vasoconstrutivos. Com ratos foram observados efeitos diretos e indiretos vasoconstrutivos e vasodilatadores da hCG. Em humanos, a hCG causou relaxamento da artéria uterina e aumento da perfusão útero-placentária (RAO; LEI, 2007).

A hCG, além de auxiliar na vascularização, pode melhorar a diferenciação em células luteínicas e aumentar a esteroidogênese do CL. No trabalho de Gamboni et al. (1984) a administração de hCG causou um aumento de células esteroidogênicas maiores, que contribuem substancialmente para produção de progesterona (FITZ et al., 1982; AINSWORTH; LACHANCE; LABRIE, 1983).

Em seu experimento, Schmitt et al (1996) demonstrou que a administração da hCG no momento da ovulação aumentou a concentração de progesterona da fase luteal subsequente. A longa meia-vida da hCG no plasma, combinado com sua persistência na superfície de células luteais quando se liga aos receptores, provavelmente supera qualquer efeito endógeno dos pulsos de LH. Além disso, talvez esta longa meia-vida da hCG no plasma possa auto-regular o número de receptores de LH no tecido folicular e do CL. Mock e Niswender (1983) reportaram que o período para internalização e degradação de hCG radiomarcado (22,8 h $\pm$ 2,3h) pelas células luteais ovinas é muito mais prolongado se comparado com o LH (0,4 $\pm$ 0,2 h). Este prolongado tempo de ligação da hCG às membranas das células

luteais pode ser responsável pelo aumento do seu efeito estimulatório na concentração de progesterona da fase luteal subsequente.

O crescimento folicular requer um ambiente endócrino específico para ocorrer. Hormônios esteróides e vários peptídeos produzidos localmente e em sítios distantes são responsáveis em fornecer um ambiente ótimo. Mudanças nesse ambiente podem impedir o oócito de estar hábil para fecundação ou resultar em embriões de baixa qualidade. Embora o ambiente folicular seja primariamente influenciado pelo tipo de gonadotrofina à qual o folículo é exposto durante a fase folicular, uma injeção de hCG que dispara mudanças na luteinização também possui influência significativa neste ambiente (KOVACS et al., 2008).

A angiogênese dos folículos durante a fase folicular do ciclo estral alcança seu máximo no momento do pico de LH, sendo completada no estágio após o pico de LH do ciclo estral. Resultados do estudo de Chowdhury et al. (2010) demonstram que fatores angiogênicos como: VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), VEGFR-2, Ang-1(angiotensina 1) e Ang-2 são expressos em folículos antrais maiores do que 2 mm de diâmetro e, em todos os estágios do ciclo estral examinados (Fase luteínica, pré e pós LH). A expressão de todos esses fatores angiogênicos foi maior após o estágio de LH e menor durante a fase luteínica do ciclo estral. Todos esses fatores e seus RNAm foram expressos nas células da teca e granulosa, mas a expressão foi consistentemente maior nas células da teca. Com isso, especula-se que o aumento da expressão desses fatores é provocada pela exposição ao pico de LH e/ou retirada da progesterona. Em outras espécies a expressão do mRNA de VEGF nas células da granulosa foi estimulado pelo LH ou hCG (KOOS, 1995). O LH também aumentou a expressão de VEGF na granulosa de células cultivadas *in vitro* (MARTINEZ-CHEQUER et al., 2003). Diante destes dados, acredita-se que a hCG pode contribuir para aumentar a angiogênese de folículos maiores durante a fase folicular do ciclo estral, o que pode auxiliar no seu desenvolvimento e posterior luteinização (KOVACS et al., 2008).

Uma das principais desvantagens da hCG é que, além do seu alto custo, já foi relatado que o uso repetido de hCG em bovinos pode induzir a formação de anticorpos, e estes podem neutralizar a molécula de hCG e reduzir drasticamente sua ligação aos receptores (SUNDBY; TORJENSEN, 1978).

Hoje, sabe-se através de estudos na maioria com humanos e suínos, que existem receptores LH/hCG em tecidos extra-gonadais como: tuba-uterina, útero,

cervix, placenta, oócito/blastocisto/embrião no estágio inicial, cérebro e outros; o que aumentam as possibilidades do uso terapêutico da hCG (FIELDS; SHEMESH, 2004; RAO; LEI, 2007). Embora Pakarainen et al. (2007) concluem que são necessárias mais evidências para considerar funcionalmente significativa a expressão destes receptores LH/hCG extra-gonadais.

Com isto, além da ação luteotrófica e vasoativa, outros estudos demonstraram que a hCG também contribuiu para o desenvolvimento do conceito e a placentação (KHAN et al., 2003; CAM; KURAN, 2004; KHAN; BECK. KHALID, 2007) e segundo Nephew et al. (1994) para aumentar a secreção de IFN- δ , importante para o reconhecimento materno da gestação em ovelhas (SPENCER et al., 2004; GREEN et al., 2005; KHAN; BECK; KHALID, 2007; WEEMS, et al., 2007). Uma hipótese para o estímulo da hCG no crescimento do conceito e placentação é que a hCG aumenta as concentrações de progesterona, o que pode estimular a secreção de substâncias embriotróficas, como as proteínas endometriais (ASHWORTH; SALES; WILMUT, 1989; NEPHEW, et al., 1994), que podem estar associadas com a aceleração do crescimento do conceito. Outra hipótese é a ação direta embriotrófica da hCG, como já foi relatado em coculturas de embriões bovinos (MISHRA; LEI; RAD, 2003).

Portanto, a hCG possui receptores em inúmeros tecidos do corpo, com uma vasta possibilidade de efeitos diretos e indiretos. Dentre estes efeitos podemos citar: luteotrófico, vasoativo e embriotrófico, que podem agir de forma associada para melhorar a eficiência reprodutiva dos animais. Apesar disto, os estudos com tratamento de hCG para induzir a ovulação em ovinos ainda são escassos, principalmente em ovelhas da raça Santa Inês.

2.8 ESTUDOS COM PROTOCOLOS HORMONAIS EM OVINOS

Sabe-se da importância do desenvolvimento de protocolos hormonais eficientes para garantir a produção de carnes em escala e de qualidade. Um dos principais entraves no sucesso dos estudos com ovinos ocorre devido à enorme variação de resultados e fatores que o influenciam, como: região, ambiente, clima,

temperatura, manejo, protocolos hormonais, raça e diferenças entre indivíduos. Contudo, especialmente em ovinos, são necessários estudos bem específicos (de acordo com país, clima, temperatura, manejo, raça e etc) e a comparação entre dados da literatura torna-se um pouco equivocada. Mas como referência, seguem em ordem cronológica, alguns estudos com protocolos hormonais em ovelhas.

Leyva et al. (1998) avaliaram o efeito da esponja intravaginal de MAP na dinâmica folicular, função luteínica e intervalo para ovulação quando a esponja foi inserida em 3 diferentes estágios do ciclo estral. Para este experimento foram utilizadas ovelhas Suffolk cíclicas (n=12). As esponjas foram colocadas por 12 dias iniciando nos dias: 0, 6 ou 12 após a ovulação. O intervalo inter-ovulatório diferiu significativamente entre os tratamentos ($16,4 \pm 0,2$; $22,8 \pm 0,2$ e $28,4 \pm 0,2$ dias nos tratamentos iniciados nos dias 0, 6 e 12, respectivamente). Todas as ovelhas com tratamento no dia 0 demonstraram 3 ondas foliculares. Tratamento no dia 0 resultou em um retorno precoce aos níveis basais de progesterona ($13,6 \pm 0,4$ dias) em comparação aos dias 6 ($16,3 \pm 0,5$ dias) e 12 ($16,2 \pm 0,4$ dias). A ovulação ocorreu mais cedo nos tratamentos do dia 0 ($83,6 \pm 5$ h) e 12 ($79,6 \pm 5$ h) se comparados ao dia 6 ($93,5 \pm 6$ h). O pico de LH ocorreu em média no momento similar entre os tratamentos do dia 0 (54 ± 4 h) e do dia 12 (53 ± 5 h). O pico de LH demonstrado por uma única ovelha do tratamento do dia 6 ocorreu aproximadamente 58 h após a remoção da esponja. Concluíram que o tratamento com esponja de MAP não sincronizou o estro e a ovulação adequadamente devido ao diferente padrão folicular no início do protocolo.

O trabalho de Viñoles et al. (2001) teve como objetivo avaliar o efeito do período de tratamento com progestágeno (12 vs 6 dias), e o efeito da aplicação de eCG na dinâmica folicular, sincronização do estro e taxa de prenhez. Foram utilizadas ovelhas Polwarth, com média de 4 anos de idade e escore corporal de $3,5 \pm 0,1$ U. O experimento foi conduzido no Uruguai, no período de estação de acasalamento (mês de abril). Os grupos foram divididos em 4 tratamentos: Tratamento curto com progestágeno por 6 dias (ST- MAP); tratamento curto com progestágeno e aplicação de 250 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo (STeCG); tratamento longo com progestágeno por 12 dias (LT- MAP) e tratamento longo com progestágeno por 12 dias e aplicação de 250 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo (LTeCG- MAP). No momento da retirada da esponja a média de concentração de progesterona no tratamento curto foi de $12 \pm 2,7$ pmol/L,

indicando que algumas ovelhas ainda tinham CL funcional. Já no tratamento longo a concentração de progesterona foi significativamente mais baixa ($4,5 \pm 1,9$ pmol/L). A emergência do folículo ovulatório ocorreu antes da retirada da esponja no tratamento longo (-3,8 e -2,2 dias para LT e LTeCG, respectivamente), enquanto que no tratamento curto a emergência ocorreu próximo à retirada da esponja. Três ovelhas do STeCG não ovularam, e o maior folículo presente no momento da administração do eCG continuou a crescer, indicando a formação de cisto folicular. Nestas ovelhas a concentração de estradiol alcançou níveis altos entre 25 e 102 pmol/L. Em todas as ovelhas foi detectado aumento da concentração de estradiol após a remoção da esponja. Sendo a concentração máxima similar entre os grupos e não diferiu com a concentração máxima de estradiol observada antes da ovulação espontânea. A taxa de gestação foi maior no tratamento curto sem eCG (87%) do que no restante dos grupos 58%, 63% e 67% para STeCG, LT e LTeCG, respectivamente. Este estudo demonstrou que o período de tratamento com progestágeno afetou a dinâmica folicular e determinou a duração do crescimento do folículo destinado a ovular, o que foi inversamente relacionado com a gestação. Concluíram que baixas taxas de gestação observadas após o tratamento longo foi relacionado com lento turnover folicular o que promoveu a ovulação de folículos persistentes. O tratamento curto resultou em maiores taxas de gestação provavelmente devido à ovulação de um novo folículo recrutado. E a aplicação de eCG não trouxe vantagens quando associado com tratamento longo, além de ter um efeito deletério quando associada ao tratamento curto.

Menegatos et al. (2003), com o objetivo de caracterizar eventos endócrinos durante o período de periestro, assim como o estro subsequente à sincronização, compararam duas fontes de progesterona no protocolo de sincronização durante a estação de acasalamento. A raça utilizada foi Chios. Os tratamentos foram divididos em dois grupos. Grupo1: MAP por 14 dias + 500 UI de eCG e Grupo2: implante subcutâneo de progesterona por 14 dias + 500 UI de eCG. Média de intervalo entre retirada da progesterona ao estro foi de 45,3 h para MAP e de 21,5 h para o implante de progesterona ($P < 0,001$). Durante o tratamento os níveis circulantes de progesterona foram de 1,02 ng/ml e 1,43 ng/ml para a esponja e o implante, respectivamente; enquanto que no dia da retirada da progesterona os níveis caíram para 0,2 ng/ml em ambos os grupos. O intervalo entre retirada e pico de estrógeno foi de 21,0 h e 20,4 h para grupos MAP e implante de progesterona,

respectivamente. O intervalo entre retirada e pico de LH foi de 56,5 h e 31,2 h para grupos MAP e implante de progesterona ($P<0,05$), respectivamente. O intervalo entre pico de estrógeno e o estro foi estimado em 26,7 e 2,7 para MAP e implante de progesterona. O intervalo entre pico de estradiol e pico de LH foi de 37 e 12,1 h para MAP e implante de progesterona ($P<0,005$). Durante o período de coleta de sangue (78h) os níveis de estradiol não diferiram entre os dois grupos, alcançando quase o mesmo valor de pico (77,5 e 76,2 ng/ml). Os níveis de progesterona durante o ciclo estral subsequente diferiram entre os dois grupos. De forma mais precisa, entre os dias seis a 10 após a remoção da esponja, os valores flutuaram de 0,28 a 1,06 para MAP, enquanto o implante de progesterona alcançou 0,62 a 2,32 ng/ml ($P<0,05$). Os resultados deste estudo demonstraram que animais que receberam progesterona natural exibiram comportamento de estro mais cedo e maior concentração de progesterona após a ovulação do que os animais que receberam progestágeno sintético.

Barrett et al. (2004) avaliaram o protocolo: 12 dias de MAP, com ou sem 500UI de eCG no dia da retirada do dispositivo em ovelhas Western White Face, durante a estação de acasalamento. Não houve diferença significativa entre ovelhas que receberam ou não o eCG no intervalo entre retirada da esponja e estro (2,6 dias), na taxa de ovulação (2,3 com eCG X 1,7 sem eCG), e no intervalo entre retirada da esponja e ovulação entre controle e tratados (3,2 X 3,2 dias). Uma ovelha tratada com eCG desenvolveu folículo luteinizado. O número médio de folículos detectados pela ultrassonografia seguida da ovulação após a retirada da esponja não foi diferente entre os grupos (1,5 controle e 2,3 tratado). O intervalo entre ovulação e detecção do CL também não variou com aproximadamente 3,6 dias. Houve uma tendência da concentração média diária de progesterona ser maior no grupo tratado com eCG (2,4 ng/ml) quando comparado ao controle (1,2 ng/ml).

Ali (2007) com o objetivo de avaliar se o período de aplicação de eCG influencia no desenvolvimento folicular e taxa de ovulação, durante a estação de acasalamento, utilizou um protocolo de 8 dias de FGA em ovelhas Ossimi ($n=18$). O experimento foi dividido em 3 grupos: sendo o Grupo1: administração de 500 UI de eCG dois dias antes da remoção da esponja. Grupo2: mesma quantidade de eCG no dia da remoção da esponja e Grupo3: o controle, sem a aplicação de eCG. Foi realizada a administração de prostaglandina no dia da retirada da esponja em todas as ovelhas. A detecção do estro e ovulação ocorreu em 100% das ovelhas do Grupo

1 e em 83,3% das ovelhas dos grupos 2 e 3. Intervalo entre estro e ovulação foi menor no Grupo 1 (32 h) se comparado aos Grupos 2 e 3 (69 e 80 h, respectivamente). A aplicação de eCG dois dias antes da retirada da esponja sincronizou melhor a ovulação, sendo que todas as ovelhas do grupo 1 ovularam no mesmo período, enquanto que as ovelhas do grupo 2, as ovulações ocorrem no período de 48 h e do grupo 3 de 72 h. Concluíram que a administração do eCG dois dias antes da remoção da esponja permitiu melhor sincronização da ovulação.

A combinação de progesterona e estradiol tem sido bastante utilizada em protocolos bovinos, pois permite melhor sincronização de emergência da onda folicular (BO, 1995). Estudos com estradiol em ovinos ainda são escassos. Mas Barrett et al (2008) em seu trabalho associou a medroxiprogesterona e 17beta-estradiol, o que resultou em pico de FSH e emergência de uma nova onda em 3-5 dias após o tratamento com estradiol. Este tratamento pode ser eficiente, contudo, uma das desvantagens é que o uso do estradiol em animais de produção é restrito em muitos países, outra dificuldade é a padronização da dose de estradiol (dose além da necessária causa um bloqueio do eixo e crescimento folicular).

Letelier et al. (2010) compararam o efeito do protocolo com progesterona na dinâmica de crescimento e funcionalidade do CL. Utilizaram 6 ovelhas Manchega com idade entre 3 e 8 anos. O experimento foi conduzido na Espanha, no período de acasalamento (outubro). O protocolo escolhido para o grupo tratado foi de 14 dias de FGA e para o grupo controle foram administradas 3 doses de cloprostenol. Dia 0 = dia da primeira detecção do estro. O CL foi visualizado pela primeira vez com 2.1 dias do ciclo estral. Houve diferença entre os grupos na concentração de progesterona plasmática no dia 10 (5.01 ± 0.24 ng/ml no grupo controle vs 4.32 ± 0.18 ng/ml no grupo progesterona- $P < 0.05$). No primeiro dia do ciclo estral, dia 1, níveis plasmáticos de LH estavam maiores no grupo controle se comparados com o grupo tratado (0,19 ng/ml vs 0,13 ng/ml). Como resultado principal, o tratamento afetou o padrão de crescimento, expressão de receptores de LH e secreção de progesterona do CL formado após o protocolo. Possíveis causas podem estar relacionadas com decréscimo na secreção de LH induzida pela administração de progestágenos. Ocorrência de CL subnormais tem sido relacionada com desenvolvimento e maturação inadequada de folículos pré-ovulatórios, o que parece aumentar durante tratamentos com progestágenos.

Segundo Menchaca et al. (2010), o tratamento de 5-7 dias com progesterona (CIDR) associado com a administração de prostaglandina e 200-300 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo e injeção de GnRH (8µg buserelin) 36 h após a retirada do CIDR garante a ovulação. Este protocolo sincroniza o pico de LH aproximadamente 40h após a retirada do CIDR, sendo que a ovulação ocorre, em aproximadamente 90% das fêmeas, dentro de 72h após a retirada do CIDR.

PAES DE BARROS (2010) estudou a dinâmica folicular do protocolo de 9 dias de sincronização com o uso de um novo dispositivo de progesterona, associado a administração de prostaglandina e 250 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo, em ovelhas da raça Santa Inês cíclicas. O estro iniciou-se em média às $36 \pm 6,41$ horas após a retirada do dispositivo vaginal. As fêmeas permaneceram em estro por $45 \pm 10,64$ horas. A média das ovulações foi de $1,63 \pm 0,51$ por ovelha. A taxa de ovulação foi de 86% (13/15). Houve formação de cisto com taxa de 13,3% (2/15). A média do diâmetro do folículo pré-ovulatório foi de $5,40 \pm 0,59$ mm. O momento da ovulação ocorreu em média, $74,3 \pm 7,56$ horas após a retirada do dispositivo vaginal. O novo dispositivo manteve entre os dias D0 e D9 a concentração plasmática de progesterona média em $11,50 \pm 3,11$ ng/mL, atingindo um pico entre o 3 e 5 dias após a colocação do dispositivo vaginal. Concluiu que o novo dispositivo de progesterona manteve a alta concentração de progesterona durante o protocolo, o que permitiu o turnover folicular, emergência sincronizada da onda ovulatória e ovulação de um novo folículo.

3 OBJETIVO

Os objetivos do presente estudo foram:

- Caracterizar a dinâmica folicular da ovelha Santa Inês no protocolo de nove dias de dispositivo vaginal, sem e com a administração de hCG.
- Avaliar o efeito da administração de hCG na indução e sincronização da ovulação.
- Avaliar o efeito da administração de hCG na concentração de progesterona.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos abordarão os temas relacionados ao manejo e execução deste trabalho assim como as metodologias empregadas para a elaboração das análises estatísticas.

4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS

Este experimento foi realizado nas instalações do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo (23°34'10"S; 46°44'20"O), com início em maio de 2009.

Foram utilizadas 9 fêmeas ovinas da raça Santa Inês, com escore variando entre 3 e 4 (ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ; SANZ; JOY, 2009) e comprovada fertilidade (múltiparas). A alimentação (ração e feno) foi fornecida na parte da manhã e à tarde e o sal mineral (Ovinofós – Tortuga) e água foram fornecidos à vontade. Antes do início do experimento foram realizados exames ultrasonográficos para certificar da presença do CL, e consequentemente da ciclicidade das ovelhas, além da ambientação dos animais ao procedimento dos exames.

Como descrito por Paes de Barros (2010) houve um manejo de adaptação ao novo ambiente para facilitar a realização dos exames. Este manejo consistiu basicamente em, no início entrar na baia e esperar até que os animais ficassem calmos e acostumados com a presença do pesquisador e, em seguida, fornecer um punhado de ração para cada ovelha que permitisse o contato físico. Com a repetição deste método foi observado calma e confiança dos animais para realização dos exames ultrassonográficos e coletas de sangue. Isto contribuiu para a execução dos repetidos exames.

4.2 TRATAMENTOS

Para a melhor condução do experimento este foi dividido em duas etapas consecutivas, intervaladas com período de 35 dias, sendo 9 ovelhas em cada etapa. Na primeira etapa, os animais foram divididos aleatoriamente em um de dois tratamentos: Grupo Controle (GC) e Grupo hCG (GhCG). Na segunda etapa do experimento as ovelhas foram alocadas em cada tratamento de forma que, as que estavam no grupo GC foram para o GhCG e vice-versa.

No início do experimento todas as ovelhas estavam em fase luteínica evidenciado pela concentração de progesterona acima de 1ng/ml e presença de corpos lúteos.

No GC, as ovelhas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Primer-PR®, Tecnopec, Brasil) no D0. No D9, o dispositivo de progesterona foi removido e administraram-se 30 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Syntex, Argentina) e 250 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda). No GhCG, as ovelhas receberam o mesmo protocolo dos animais do GC, porém foi administrada 24 horas após a retirada do dispositivo, 500 UI de hCG (Vetecor®, HertapeCalier-Espanha) (figura 1).

Figura 1 – Diagrama de tratamento

4.3 EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS

Os exames ultrassonográficos para o acompanhamento da dinâmica folicular na primeira etapa foram realizados de 12 em 12 horas com início na retirada do dispositivo (D9) até a ovulação. Na segunda etapa do experimento, os exames foram diários do D0 até o D9 e, a partir daí, de 12 em 12 horas até a ovulação (figura 1). Foi utilizado um ultra-som (ALOKA-SSD500, Berger, Brasil), com scanner no modo-B, equipado com transdutor linear de 5.0 MHz, adaptado a um suporte de plástico, para facilitar a manipulação no reto do animal. Durante os exames, as ovelhas foram contidas em um tronco construído para este fim (figura 2). Neste tronco, havia a possibilidade de proceder o exame nas ovelhas em estação ou em posição inclinada. De acordo com a dificuldade de visualização dos ovários, algumas alternativas foram utilizadas como descrito por Paes de Barros (2010).

No momento do exame, o transdutor foi inserido no reto dos animais com auxílio de gel lubrificante, até a visualização da vesícula urinária e útero; a partir daí o transdutor era rotacionado para ambos os lados (direito e esquerdo) para visualização dos ovários. Quando encontrado o ovário, a imagem do monitor era congelada para a mensuração dos folículos pela média dos dois maiores diâmetros dos mesmos e do diâmetro do CL (figura 3).

Durante cada exame, foram desenhados diagramas de ambos ovários, com o posicionamento relativo dos folículos de diâmetro igual ou maior a três mm (3 mm).

A ovelha foi considerada ovulada quando o folículo que vinha sendo acompanhado não era visto no exame seguinte, que foi confirmado com a visualização do corpo lúteo em exames posteriores e concentração de progesterona.

Doze dias após a retirada do dispositivo foi anotado o diâmetro do(s) CL(s) formado(s). Além disto, também foram anotados os dados do útero quanto à ecogenicidade sendo classificado como 1 – ausência de líquido intra-uterino observado pela homogeneidade de ecos na imagem, 2 – presença de líquido pela observação de imagens não-ecogênicas entre as hipoecogênicas e 3 - grande presença de líquido pela predominância de imagens não-ecogênicas. Esta metodologia de avaliação da ecogenicidade uterina foi adotada com o objetivo de avaliar se os dispositivos vaginais causam acúmulo de líquido intra-uterino.

Figura 2- Detalhe do tronco utilizado para conter os animais durante exame ultrassonográfico – São Paulo - 2009

Figura 3 – Imagem ultrassonográfica evidenciando bexiga, útero e ovário, com presença de folículos e corpo lúteo – São Paulo - 2009

4.4 RUFIAÇÃO PARA A DETECÇÃO DO ESTRO

A rufiação foi realizada desde a retirada do dispositivo de progesterona até o final do estro, com auxílio de um carneiro. Este era conduzido, até a baia das fêmeas, preso a uma corda, em três diferentes momentos do dia, às 10 horas da manhã, 6 horas da tarde e meia noite. Como esta baia tem uma divisão, possibilitou o manejo de monta controlada, ou seja, as ovelhas foram introduzidas uma a uma em contato com o carneiro. Os sinais de urinar e fugir do carneiro correspondiam às fêmeas fora do estro; e o abanar de cauda ou imobilidade com a proximidade e tentativa de monta do carneiro, de ovelha em estro. Não foi permitida a monta completa das ovelhas em estro.

4.5 COLHEITAS DE SANGUE PARA DOSAGEM DE PROGESTERONA

As coletas de sangue foram realizadas sempre no período da manhã (entre 9 e 10h) por punção da veia jugular externa por meio de agulha e tubo a vácuo, sem anticoagulante, do sistema Vacutainer (BD®). O sangue coletado era levado ao Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) e centrifugado a 1500 G por 20 minutos. Em seguida o soro era retirado com auxílio de pipeta e ponteira individual, colocado em tubo Eppendorf®, identificado e armazenado em freezer a – 20°C. Os dias de colheita de sangue foram: 0, 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19 e 21 da colocação do dispositivo.

4.6 ANÁLISE DA PROGESTERONA POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

Para dosagem da progesterona sérica, utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial

da Siemens® (COAT – A – COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona no soro humano, e validado previamente para uso em soro de ovinos (MEIKLE et al., 2001). Os ensaios hormonais foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina empregada no Laboratório de Dosagens Hormonais. Foram calculados os Coeficientes de Variação (CV) intra-ensaio, utilizando-se valores altos e baixos, no início e final de cada ensaio. Foi também calculada a porcentagem de ligação B/BO, a sensibilidade e a dose mínima detectada para cada ensaio. A sensibilidade do ensaio para P4 foi de 0,01ng/mL, e o coeficiente de variação intra-ensaio para valores baixo e alto foram, respectivamente de 3,21% e 1,93%.

4.7 METODOLOGIAS DAS ANÁLISES

Os momentos de entrada e saída do estro foram calculados pela média dos dois últimos horários em que se observou a mudança do comportamento da ovelha em aceitar ou não a presença do carneiro.

Foi considerada regressão folicular quando observado um folículo com diâmetro maior do que 3 mm no D0, aumento de diâmetro no D1 e posterior diminuição até o diâmetro menor ou igual a 3 mm.

O momento da emergência da onda ovulatória foi encontrado pelo acompanhamento retroativo do maior folículo nos diversos tempos, desde o folículo ovulatório até ser encontrado um folículo de 3mm.

A taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório foi calculada pela diferença entre maior e o menor diâmetro folicular dividido pelo período (dias).

A ovulação foi definida como o desaparecimento do maior folículo que vinha sendo acompanhado a cada 12 horas nos exames ultrassonográficos anteriores e confirmada pelo subsequente aumento da concentração de progesterona e

visualização do corpo lúteo. A ovulação foi calculada pela média entre o horário da última visão do folículo ovulatório e o horário onde se detectou a ovulação.

A taxa de ovulação foi determinada pela divisão entre o número de folículos pré-ovulatórios que desapareceram com o número de corpos lúteos detectados ultrassonograficamente (Leyva et al., 1998).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2003). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados que não atenderam às primícias da análise de variância foram transformados (concentração de progesterona - raiz quadrada). Após essa avaliação, o procedimento GLM e o Teste de Tukey foram utilizados para análise de variância e para determinar diferença de médias entre os tratamentos nos diferentes momentos estudados, respectivamente. As variáveis de distribuição não paramétrica (período em estro, intervalo entre estro e ovulação, número de ovulações entre ovários: esquerdo e direito) foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney e pelo procedimento GENMOD do SAS®. Considerou-se diferença significativa entre as variáveis testadas quando o $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados do experimento estão descritos a seguir.

5.1 GRÁFICOS DE DINÂMICA FOLICULAR.

Gráficos de dinâmica folicular de cada ovelha, do GC e GhCG, na segunda etapa do experimento, evidenciando a concentração de progesterona (ng/ml), regressão folicular no início do protocolo (D0) e a emergência da onda ovulatória próximo à retirada do dispositivo de progesterona (D9).

Gráfico 1- Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo controle durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina e eCG

Gráfico 2 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo controle durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina e eCG

Gráfico 3 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo controle durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina e eCG

Gráfico 4 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo controle durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina e eCG

Gráfico 5 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo controle durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina e eCG

Gráfico 6 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo hCG durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina, eCG e tratada 24 h (D10) após a retirada do dispositivo com hCG

Gráfico 7 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo hCG durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina, eCG e tratada 24 h (D10) após a retirada do dispositivo com hCG

Gráfico 8 - Dinâmica folicular de uma ovelha do grupo hCG durante o protocolo hormonal, que consistiu na inserção do dispositivo de progesterona no D0, retirada no D9 associado à aplicação de prostaglandina, eCG e tratada 24 h (D10) após a retirada do dispositivo com hCG

Na segunda etapa do experimento não foi possível detectar o exato momento de ovulação de uma ovelha do GhCG e portanto, seus dados nesta etapa não foram considerados.

A regressão dos folículos maiores do que 3mm presentes no D0 ocorreu, em média, $3,54 \pm 1,5$ dias após a colocação do dispositivo. A emergência da onda folicular ovulatória ocorreu em média $7,88 \pm 1,05$ dias após a colocação do dispositivo (gráficos 1-8).

Não foi observada diferença entre os grupos quanto ao diâmetro do maior folículo na retirada do dispositivo (GC: $4,56 \pm 0,99$ mm; $n=9$ vs. GhCG: $4,39 \pm 0,65$ mm; $n=8$; $P=0,68$).

O diâmetro do primeiro folículo pré-ovulatório (GC: $5,78 \pm 0,30$ mm vs. GhCG: $5,36 \pm 0,69$ mm; $P=0,09$) e diâmetro do segundo folículo pré-ovulatório nas ovelhas com dupla ovulação (GC: $5,41 \pm 0,85$ e GhCG: $4,71 \pm 0,50$; $P=0,08$), também não variaram significativamente entre os grupos.

Não houve diferença significativa no diâmetro do primeiro folículo pré-ovulatório ($P=0,4$) entre as ovelhas que tiveram ovulações simples ($5,96\pm1,04$; $n=3$) ou duplas ($5,49\pm0,43$; $n=14$). Nas ovelhas que apresentaram dupla ovulação, observou-se diferença ($P=0,01$) entre o diâmetro do primeiro ($5,49\pm0,43$; $n=14$) e segundo folículo pré-ovulatório ($4,94\pm0,55$; $n=14$).

Não houve diferença entre os grupos quanto ao diâmetro folicular no início do estro (GC: $5,4\pm0,47$ vs. GhCG: $5,07\pm0,74$ mm; $P=0,54$) e no dia da aplicação do tratamento (D10) no GhCG (GC: $4,29\pm1,05$ vs. GhCG: $4,21\pm1,09$; $P=0,861$).

Neste experimento 5,1% (2/39), sendo um folículo de cada grupo, desenvolveram-se em cisto. Os diâmetros observados foram de 11,0 e 8,9 mm.

Foi observado um aumento do líquido intra-uterino, no dia da retirada do dispositivo, correspondente com o fisiológico.

Maior taxa de comportamento de estro ($P=0.009$) foi observado no GC se comparado ao GhCG, 100% (9/9) e 37.5% (3/8), respectivamente (Gráfico 9)

Gráfico 9 - Porcentagem de animais com comportamento de estro segundo os tratamentos

Não houve diferença entre os tratamentos no intervalo médio entre retirada do dispositivo e início do estro (GC: 47.4 ± 15.0 h vs. GhCG: 32.0 ± 0.0 h; $P=0.11$ -gráfico 10).

Gráfico 10 – Dispersão do início do comportamento de estro em horas após a retirada do dispositivo segundo os tratamentos

As ovelhas permaneceram aceitando monta, em média $36,22 \pm 18,57$ h no GC (n=9). E aquelas ovelhas que demonstraram comportamento de estro do GhCG (n=3), em média, permaneceram aceitando monta por $38,6 \pm 30,6$ h, sem diferença entre os grupos ($P=0,72$).

Em média, o intervalo entre início do estro e ovulação foi de $32,56 \pm 10,9$ h para o GC (n=9) e de $20 \pm 3,0$ h para o GhCG (n=3), com diferença significativa entre os grupos ($P=0,003$).

Verificou-se diferença estatística entre os grupos experimentais no intervalo entre retirada do dispositivo e ovulação (GC: $79,9 \pm 15,4$ h vs. GhCG: $54,7 \pm 4,9$ h; $P=0,001$). Além disso, os animais que receberam hCG (n=8) tiveram as ovulações ocorrendo de forma mais sincronizada (gráfico 11).

Gráfico 11 – Dispersão da ovulação segundo o tratamento em horas após a retirada do dispositivo

A taxa de ovulação foi de 84,61% (33/39) pela posterior visualização dos corpos lúteos ipsilaterais aos das ovulações. Em média, foram observadas 1,94 ovulações por ovelha, sem diferença significativa entre os grupos (GC: 2 vs. GhCG: 1,87 ovulações por ovelha; $P=0,72$).

A taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório foi de $0,70 \pm 0,2 \text{ mm/dia}$ ($n=17$), sem diferença entre os grupos (GC: $0,67 \pm 0,21$ vs GhCG: $0,76 \pm 0,19$; $P=0,35$).

Considerando-se as ovelhas de ambos os grupos (GC e GhCG), 17,65% (3/17), 70,59% (12/17) e 11,76% (2/17) das ovelhas demonstraram ovulações do tipo: simples, dupla ou tripla, respectivamente.

Comparando-se os dados de ovulações simples e duplas, não houve diferença significativa ($P=0,56$) entre os grupos GC e GhCG (Tabela 1), sendo o intervalo médio entre as ovulações de $16 \pm 6,93 \text{ h}$ ($n=12$).

Tabela 1 - Percentagem de ovulações simples e duplas entre os grupos controle e tratado.

Grupo	Simples	Dupla	Total
GC	1 (7%)	7 (47%)	8 (53%)
GhCG	2 (13%)	5 (33%)	7 (47%)
Total	3 (20%)	12 (80%)	15 (100%)

Houve maior número de ovulações ($P=0,03$) no ovário direito se comparado com o esquerdo, sem diferença ($P=0,42$) entre os grupos GC e GhCG (Tabela 2).

Tabela 2 - Proporção de ovulação entre os ovários: esquerdo e direito.

Tratamento	Ovário Direito	Ovário Esquerdo	Total
GhCG	11	4	15
GC	10	8	18
Total	63,7% (21/33)a	36,7% (12/33)b	33

Letras diferentes entre as colunas: $p<0,05$

A presença do dispositivo foi responsável pela manutenção de altas concentrações de progesterona no período do protocolo, conforme demonstrado na figura 4. A concentração sérica média entre D0 e D8 foi de $11,06\pm 4,82$ ng/ml para GC ($n=9$) e de $9,74\pm 4,37$ ng/ml para GhCG ($n=8$), sem diferença entre os grupos ($P=0,49$).

Não houve a ocorrência de perda do dispositivo, aderência ou vaginite no final do tratamento, sendo que o dispositivo foi facilmente removido em todas as ovelhas.

Figura 4 – Concentração sérica de progesterona (ng/mL) em ovelhas Santa Inês durante a permanência do dispositivo vaginal Primer-PR®

A concentração de progesterona foi maior no GhCG se comparado com GC nos dias 14 e 17 da colocação do dispositivo (figura 5).

Figura 5 – Concentração sérica de progesterona (ng/mL) em ovelhas submetidas ao protocolo de sincronização. * Diferença estatística ($P < 0,05$)

A média de concentração de progesterona após a retirada do dispositivo (10 ao 21) foi de $3,52 \pm 3,11$ para o GC e de $4,48 \pm 4,00$ para o GhCG, sem diferença significativa entre os grupos ($P = 0,46$).

A média de diâmetro luteínico total encontrada foi de $9,45 \pm 3,84$ mm para o GC ($n = 18$) e de $9,36 \pm 2,94$ mm para o GhCG ($n = 15$), sem diferença significativa entre os grupos ($P = 0,94$).

Considerando-se as duplas-ovulações ($n = 12$), a média de diâmetro do maior CL (CL1) formado não foi diferente entre os grupos (GC: 11,6 mm vs GhCG: 10,38 mm; $P = 0,62$) assim como a média do menor CL (CL2) formado (GC: 7,54 mm vs GhCG: 8,12 mm; $P = 0,9$).

Considerando os dados de diâmetro do CL de ambos os grupos houve diferença estatística ($P = 0,023$) entre a média de diâmetro do CL1 (10,79 mm; $n = 12$) e CL2 (7,77 mm; $n = 12$) nas ovelhas com dupla-ovulação.

6 DISCUSSÃO

A regressão dos folículos em média 3,5 dias após a inserção do dispositivo e a emergência da onda folicular ovulatória em aproximadamente 8 dias após a inserção do dispositivo estão em concordância com o trabalho de Paes de Barros (2010), que utilizou o mesmo protocolo de sincronização. Possivelmente, a alta concentração de progesterona (próxima de 10 ng/ml) fornecida pelo dispositivo, reduziu a frequência de pulso de LH, com consequente regressão dos folículos presentes nos ovários, rápido turnover folicular e emergência da onda ovulatória próximo à retirada do dispositivo. Seekallu; Toosi e Rawlings (2009) concluíram que, em ovelhas cíclicas, são necessários poucos pulsos e baixa concentração sérica de LH para manter a emergência, crescimento e regressão dos folículos em desenvolvimento. Portanto, a alta concentração de progesterona deste protocolo atuou de forma positiva na regressão folicular no início do tratamento e não impediu a emergência da onda ovulatória, que ocorreu próximo à retirada do dispositivo.

A concentração média de progesterona sérica próxima de 10 ng/ml, durante o protocolo, foi semelhante ao observado por Paes de Barros (2010) e ocorreu pela associação entre progesterona exógena e endógena fornecida pelo CL. Furtado (2007) reportou uma concentração fisiológica média em ovelhas Santa Inês de 5,48 ng/ml e um pico próximo de 7,2 ng/ml.

Ainda que não se conheça o perfil de liberação de progesterona do dispositivo utilizado, está claro que esta concentração é muito superior aos valores encontrados em outros trabalhos com ovelhas cíclicas (WHEATON et al., 1993; MENEGATOS et al., 2003; BARRETT et al., 2004; LETELIER et al., 2010). Como relatado por Valentim (2004), são necessários estudos para fabricar dispositivos com quantidade de progesterona ideal para cada espécie, raça e grupo animal. No entanto, a alta concentração de progesterona encontrada neste estudo foi importante para causar o turnover folicular e evitar a ocorrência de folículos persistentes já observados em ovinos (VIÑALES et al., 1999).

Como não foi observada diferença entre os grupos quanto ao diâmetro do maior folículo na retirada do dispositivo, próximo de 4 mm como visto por Letelier et al. (2009) e no dia da aplicação de hCG (D10), parece que não houve influência do

diâmetro folicular nos resultados. Além disso, acredita-se que o momento de aplicação de hCG não interferiu no desenvolvimento folicular, pois também não foi observado diferença entre os grupos quanto ao diâmetro máximo do primeiro e segundo folículos pré-ovulatórios, que estão de acordo com o observado por outros autores (DI WU et al., 2009; TOSSI et al., 2009; PAES DE BARROS, 2010).

Assim como revisado por Menchaca et al. (2010) um, dois e no máximo três folículos emergiram de um pool de folículos e continuaram seu crescimento até atingir um diâmetro ovulatório.

A taxa de formação de cistos deste trabalho é compatível com o que vem sendo observado na literatura (VIÑALES et al., 2001; BARRETT et al., 2004; PAES DE BARROS, 2010) em ovelhas submetidas a protocolos hormonais, principalmente com o uso de eCG. Alguns autores discutem se estes folículos podem influenciar de forma negativa na fertilidade (MOOR et al., 1985; HUSEIN; ABABNEH, 2008). Outros acreditam na importância do eCG para eficiente indução e sincronização do estro, aumento da concentração de progesterona e conseqüente aumento da taxa de gestação (VIÑALES et al., 2001; BARRETT et al., 2004; RODRIGUES, 2004; LUTHER et al., 2007). De forma geral, o eCG é uma importante ferramenta para permitir a ovulação de ovelhas em anestro. Em ovelhas cíclicas ele auxilia na sincronização do estro, o que contribui para melhorar a fertilidade do rebanho.

O autor já observou a ocorrência de aumento de líquido intra-uterino, aderência e vaginite no final de protocolos mais longos (12 dias) com esponjas impregnadas com MAP, levando a transtornos reprodutivos e de manejo. Isto não foi observado neste experimento com a utilização do novo dispositivo de liberação lenta de progesterona e está em concordância com PAES DE BARROS (2010).

A maior taxa de comportamento de estro no grupo controle já foi relatado em outros experimentos em que a ovulação foi induzida com GnRH ou hCG. Isto possivelmente ocorre por causa do pico precoce de LH causado pela indução exógena (NEVES et al., 2010). Portanto, o tratamento com hCG neste protocolo elimina a necessidade de visualização do estro.

O intervalo entre retirada do dispositivo e início do estro do grupo controle foi semelhante ao encontrado por Barrett et al. (2004) utilizando um protocolo de 12 dias de MAP, com ou sem eCG; por Bihel (2009) com os protocolos de 7 e 11 dias com CIDR novo e usado e por Paes de Barros (2010), utilizando o mesmo protocolo.

O intervalo entre retirada do dispositivo e ovulação do grupo controle também foi semelhante ao encontrado por outros autores (BARRETT et al., 2004; Di Wu et al., 2009; PAES DE BARROS et al., 2010).

Paes de Barros (2010) sugere que para viabilizar uma inseminação em tempo fixo com sêmen descongelado existe a necessidade da aplicação de um indutor de ovulação para sincronizar ou diminuir a dispersão entre as ovulações, pois em seu trabalho observou sincronização da emergência folicular, mas com uma considerável dispersão de ovulação.

Contudo, o tratamento com hCG no presente experimento causou ovulação mais precoce e sincronizada ($54,7 \pm 4,0$ h). E não alterou a taxa de ovulação, que também foi semelhante à encontrada por Paes de Barros (2010).

Assim como relatado por Shabankareh; Habibizad e Torki (2009) houve maior número de ovulações no ovário direito se comparado com o esquerdo, sem interferência do tratamento com hCG. O que vai de encontro com dados de Ali; Derar e Hussein (2006) e Reyna (2007) que não observaram diferenças no número de ovulações entre os ovários: esquerdo e direito. Alguns fatores inerentes à anatomia da raça estudada como rede vascular e drenagem linfática entre os ovários podem estar envolvidos na discrepância de resultados encontrados na literatura (SHABANKAREH; HABIBIZAD; TORKI, 2009).

Não foi observada diferença no diâmetro do primeiro folículo pré-ovulatório entre as ovelhas que apresentaram ovulações simples ($5,96 \pm 1,04$) ou duplas ($5,49 \pm 0,43$). Entretanto, considerando-se apenas ovelhas com dupla ovulação, houve diferença entre o diâmetro do primeiro ($5,49 \pm 0,43$) e segundo folículo pré-ovulatório ($4,94 \pm 0,55$), corroborando com os achados de Paes de Barros (2010). Esse último resultado foi confirmado neste presente trabalho com a diferença no diâmetro dos corpos lúteos formados (CL1 e CL2) em ovelhas com dupla ovulação. O que confirma a hipótese de dominância folicular atenuada na onda ovulatória de ovinos (MENCHACA et al., 2010), sendo que a dose administrada de eCG não contornou este processo.

A média da taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório foi de 0,7 mm/dia, semelhante ao encontrado por Paes de Barros (2010) com protocolo de 9 dias sem a utilização de eCG ($0,73 \pm 0,43$ mm por dia). Evans et al. (2000) avaliando a dinâmica folicular dentro de um ciclo estral fisiológico de ovelhas Suffolk e Texel, encontraram uma taxa de crescimento do folículo ovulatório de 0,9mm/dia, sendo a

mesma taxa observada por Toosi et al. (2009) após a avaliação de um protocolo de 14 dias de MAP em ovelhas Western White Face. Menchaca e Rubianes (2004) em seu trabalho de revisão destacaram que a taxa de crescimento do maior folículo de cada onda é de aproximadamente 1mm/dia. Esta grande divergência de resultados ocorre provavelmente, pelas diferenças experimentais (local, ambiente, raças e protocolos utilizados) e também pelas metodologias de análises empregadas.

Houve maior concentração de progesterona 5 e 8 dias após a retirada do dispositivo no GhCG se comparado com o GC. Mas o fato de não apresentar diferença na média de concentração de progesterona após a retirada do dispositivo entre os grupos, indica que a hCG promoveu a ovulação precoce e com isso, o CL do GhCG se desenvolveu antes do CL do GC, tornando a concentração de progesterona maior em determinados dias após a ovulação no GhCG, se comparado com o grupo controle. Em bovinos, já foi observado um aumento na concentração de progesterona após a administração de hCG durante metade da fase luteínica, mas este efeito não ocorreu quando a hCG foi administrada durante o início ou fim da fase luteínica (DIAZ, 1998).

Contudo a hCG causa um aumento precoce na concentração de progesterona, que não necessariamente será superior ao grupo controle. Este precoce aumento da concentração de progesterona pode contribuir para melhorar a eficiência do processo de reconhecimento materno da gestação, que em ovelhas ocorre aproximadamente, 13 dias após a ovulação.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições em que foram conduzidas este experimento podemos inferir que:

1. Foi possível caracterizar a dinâmica folicular da ovelha Santa Inês dentro do protocolo de 9 dias de sincronização, sendo que a emergência da onda ovulatória ocorreu em aproximadamente 8 dias após a colocação do dispositivo e a ovulação ocorreu com diâmetro folicular próximo de 5,7 mm.
2. A aplicação de hCG induziu a ovulação de forma mais precoce e sincronizada.
3. A aplicação de hCG causou aumento precoce sem contudo elevar os valores médios da concentração de progesterona.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- ADAMS, G.; MATTERI, R.; KASTELIC, J.; KO, J.; GINTHER, O. Association between surges of FSH and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992.
- ADAMS, G. P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **Journal Reproduction Fertility supplement**, v. 54, p. 17-32, 1999.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.
- AINSWORTH, L.; LACHANCE, R.; LABRIE, F. Effects of progestagen treatments and PMSG on the induction of the preovulatory LH discharge in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 5, p. 281-286, 1983.
- AINSWORTH, L.; WOLYNETZ, M. S. Synchronization of estrous and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestogens administered by subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. **Journal of Animal Science**, v. 54, p. 1120-1127, 1982.
- AL-INANY, H.; ABOULGHAR, A.; MANSOUR, R.; PROCTOR, M. Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. **Human Reproduction**, v. 20, p. 2061-2073, 2005.
- ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 33-37, 2007.
- ALI, A.; DERAR, R.; HUSSEIN, H. Seasonal variation of the ovarian follicular dynamics and luteal functions of sheep in the subtropics. **Theriogenology**, v. 66, p. 463-469, 2006.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus*

colubriformis in sheep in Brazil. **Parasitology International** , v. 59, n. 4, p. 622-625, 2010.

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, J.; SANZ, A.; JOY, M. The effect of the spring management system on blood metabolites and luteal function of ewes on Mediterranean mountain areas. **Small Ruminant Research**, v. 82, p. 18-26, 2009.

ALVES, N. G.; TORRES, C. A. A.; GUIMARÃES, J. D.; BALBINOT, P. Z.; MORAES, E. A. Dinâmica Folicular Ovariana em Caprinos. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n. 48, p. 48-60, 2005.

AMARANTE, A. F. T.; SUSIN, I.; ROCHA, R. A.; SILVA, M. B.; MENDES, C. Q.; PIRES, A. V. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 273-280, 2009.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo, 2010, p.360

ASHWORTH, C. J.; SALES, D. I.; WILMUT, I. Evidence of an association between survival of embryo and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 87, p. 23-32, 1989.

ASSELIN, E.; FORTIER, M. A. Detection and regulation of the messenger for a putative endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 125-131, 2000.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; RYAN, M. P.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n.8, p. 2219-2226, 1999.

AZEVEDO, F. M. V. M. C.; ANTONIALLI, L. M. Produção e comercialização de carne de ovinos na região metropolitana de Belo Horizonte-MG. In: SOBER Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural., 2008, Rio Branco: **Anais**: SOBER, 20-23 julho, 1-21 p.

BAIRD, D. T. Luteotropic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 95-102, 1992.

BAIRD, D. T.; MCNEILLY, A. S. Gonadotrophin control of follicular development and function during the estrous cycle of the ewe. **Journal Reproduction Fertility supplement**, v. 30, p. 119-133, 1981.

BARATTA, M.; WEST, L. A.; TURZILLO, A. M.; NETT, T. M. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 714-719, 2001.

BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, p. 311 - 327, 2004.

BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; HUCHKOWSKY, S. L.; EPP, T.; RAWLINGS, N. C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, p. 827-836, 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N. C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal Reproduction Fertility**, v. 115, p. 111-124, 1999.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; RAWLINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics during anoestrous in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 275-285, 1998.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic study of effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 3-4, p. 231-244, 2001.

BIEHL, M. V. **Uso de protocolos reprodutivos em ovelhas da raça Santa Inês sobre a sincronizaçãoe tempo médio para aparecimento do estro, e a taxa de prenhez na IATF e no repasse**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, Piracicaba, 2009.

BO, G. A. A., G.P.; CACCIA, M., L.F.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.

BODIN, L.; DRION, P.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIE, Y.; BECKERS, J. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. **Reproduction Nutrition Development**, v. 37, p. 651-660, 1997.

BOSCOS, C. M.; SAMARTZ, F. C.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrous synchronization of sheep. **Theriogenology**, v. 58, p. 1261-1272, 2002.

CAM, M. A.; KURAN, M. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 81-90, 2004.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; DI PALO, R.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; PRANDI, A.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J. Delayed treatment with GnRH agonist, hCG and progesterone and reduced embryonic mortality in buffaloes. **Theriogenology**, v. 70, p. 1544-1549, 2008.

CARNEIRO, H.; LOUVANDINI, H.; PAIVA, S. R.; MACEDO, F.; MERNIES, B.; MCMANUS, C. Morphological characterization of sheep breeds in Brazil, Uruguay and Colombia. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1-3, p. 58-65, 2010.

CHOWDHURY, M. W. H.; SCARAMUZZI, R. J.; WHEELER-JONES, C. P. D.; KHALID, M. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. **Theriogenology**, v. 73, p. 856-872, 2010.

CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G.; CAIGUA, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALES-BULNES, A. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in Hair Breed Sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 47-55, 2008.

CUMMING, I. Consistency of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 24, p. 134-135, 1971.

CUNNINGHAM, N. F. Levels of progesterone, LH and FSH in the plasma of sheep during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 45, p. 177-180, 1975.

DE RENSIS, F.; VALENTINI, R.; GORRIERI, F.; BOTTARELLI, E.; LOPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 69, p. 1077-1082, 2008.

DIAS, L. M. K.; SOUZA, J. C.; ASSIS, R. M.; RAYMUNDO, C. M. Pregnancy diagnosis, fetal quantification and gender estimation by ultra-sonography in ewes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 911-916, 2009.

DIAZ, T. S., J.P.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, M.J.; THATCHER, W.W. Human Chorionic Gonadotropin-Induced alterations in Ovarian Follicular Dynamics during the estrous cycle of heifers. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1929-1936, 1998.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and Early Foetal losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, n. 2, p. 260-267, 2008.

DOMINGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v. 69, p. 564-573, 2008.

DRIANCOURT, M. A.; FRY, R. C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 279-292, 1992.

DRION, P. V.; FURTOSS, V.; BARIL, G.; MANFREDI, E.; BOUVIER, F. Four years Of induction/synchronization os estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. **Reproduction Nutrition Development**, v. 31, p. 401-412, 2002.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P.; BARRETT, D. M. Assesment of ovarian antral follicular populations and kinetics in the ewe by means of high-resolution transrectal ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 148, 2001.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 193-194, 2002.

EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M. P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, p. 699 - 715, 2000.

EVANS, A. C. O.; FLYNN, J. D.; DUFFY, P.; KNIGHT, P. G.; BOLAND, M. P. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. **Reproduction**, v. 123, p. 59-66, 2002.

EVANS, A. C. O.; FLYNN, J. D.; QUINN, K. M.; DUFFY, P.; QUINN, P.; MADGWICK, S.; CROSBY, T. F.; BOLAND, M. P.; BEARD, A. P. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. **Theriogenology**, v. 56, n.5, p. 923 - 936, 2001.

EVANS, A. C. O.; MARTIN, F. Kinase pathways in dominant and subordinate ovarian follicles during the first wave of follicular development in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 221-231, 2000.

FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.-T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 211-219, 2011.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1326, 1996.

FIELDS, M. J.; SHEMESH, M. Extragonadal Luteinizing Hormone Receptors in the Reproductive Tract of Domestic Animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1412-1418, 2004.

FITZ, T. A.; MAYAN, M. H.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. N. Characterisation of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 703-711, 1982.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. Anais: Palestras, 2005, Goiânia. **Anais...Goiânia: CBRA**, 2005. p.1-9.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H. Reprodução Assistida em Pequenos Ruminantes. **Revista de Ciências Agrárias**, v.2, p.13, 2006. Trabalho apresentado III Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2006.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H. **Produção de caprinos e ovinos na região da mata atlântica**. In _____. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, 272 p.

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

FUKUDA, M.; FUKUDA, K.; YDING; ANDERSEN, C.; BYSKOV, A. G. Contralateral selection of dominant follicles favours pre-embryo development. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1958-1962, 1996.

FURTADO, P. V. **Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (Ovis aires)**. 2007. 96f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GAMBONI, F.; FITZ, T. A.; HAZER, P. B.; WISE, M. E.; MAYAN, M. H.; NISWENDER, G. D. Effect of human chorionic gonadotropin on induced ovine corpora luteal during the anestrous season. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 1, p. 79-88, 1984.

GASTON-PARRY, O.; HEASMAN, K.; NEMORIN, J. K. E.; ROBINSON, T. J. A radioimmunoassay for fluorgestone acetate (FGA) and its application to the measurement of plasma FGA and progesterone in ewes treated with FGA-impregnated intravaginal sponges. **Australian Journal of Biological Science**, v. 41, p. 57-67, 1988.

GIBBONS, J. R.; KOT, K.; THOMAS, D. L.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, J. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. **Theriogenology**, v. 52, p. 1005-1020, 1999.

GINTHER, J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two or three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; COOPER, D. A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311-317, 2009.

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

GOMEZ-BRUNET, A. G.; SANTIAGO-MORENO, J.; MONTORO, V.; GARDE, J.; PONS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. **Small Ruminant Research**, v. 71, p. 117-122, 2007.

GOODMAN, R. L.; JANSEN, H. T.; BILLINGS, H. J.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M. N. Neural Systems Mediating Seasonal Breeding in the Ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 5, p. 674-681, 2010.

GOODMAN, R. L.; KARSH, F. J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinology**, v. 107, p. 1286-1290, 1980.

GREEN, M. P.; SPATE, L. D.; BIXBY, J. A.; EALY, A. D.; ROBERTS, R. M. A. Comparison of the Anti-Luteolytic Activities of Recombinant Ovine Interferon- Alpha and -Tau in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 1087-1093, 2005.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HAYDER, M.; ALI, A. Factors affecting the postpartum uterine involution and luteal function of sheep in the subtropics. **Small Ruminant Research**, v. 79, p. 174-178, 2008.

HERSHMAN, J. M. Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 249-265, 2004.

HERVÉ, V.; ROY, F.; BERTIN, J.; GUILLOU, F.; MAUREL, M.-C. Antiequine Chorionic Gonadotropin (eCG) antibodies generated in goats treated with eCG for the induction of ovulation modulate the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone bioactivities of eCG differently. **Endocrinology**, v. 145, p. 294-303, 2004.

HEYMEYER, L. Carne de ovinos: resposta está nas mãos do produtor. **Jornal Agrovalor** Fortaleza, 2010. v.49, p.5.

HUSEIN, M. Q.; ABABNEH, M. M. A new strategy for superior reproductive performance of ewes bred out-of-season utilizing progestagen supplement prior to withdrawal of intravaginal pessaries. **Theriogenology**, v. 69, p. 376-383, 2008.

HUTCHINSON, J. S. M.; ROBERTSON, H. A. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. **Resident Veterinary Science**, v. 7, p. 17-24, 1966.

JEFFCOATE, L. A.; RAWLINGS, N. C.; RIEGER, D. Progesterone and the surge release of gonadotropins in the ewe. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 1, p. 209-317, 1984.

JOHNSON, S. K.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K.; LEWIS, P. E. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 13, p. 69-79, 1996.

KEATOR, C. S.; CUSTER, E. E.; HOAGLAND, T. A.; SCHREIBER, D. T.; MAH, K.; LAWSON, A. M.; SLAYDEN, O. D.; MCCracken, J. A. Evidence for a potential role of neuropeptide Y in ovine corpus luteum function. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 38, p. 103-114, 2010.

KHAN, T.; BECK, N. F. G.; KHALID, M. The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on Day 12 of pregnancy on ovarian function, plasma hormone concentrations, conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3-4, p. 247-257, 2007.

KHAN, T.; HASTIE, P. M.; BECK, N. F. G.; KHALID, M. hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 81-89, 2003.

KOOS, R. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1426-1435, 1995.

KOVACS, P.; KOVATS, T.; BERNARD, A.; ZADORI, J.; SZMATONA, G.; KAALI, S. G. Comparison of serum and follicular fluid hormone levels with recombinant and urinary human chorionic gonadotropin during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 6, p. 2133-2137, 2008.

LAND, R. B.; PELLETIER, J.; THIMONIER, J.; MAULÉON, P. A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation and plasma luteinizing

hormone concentration in the sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 58, p. 305-317, 1973.

LAPTHORN, A. J.; HARRIS, D. C.; LITTLEJOHN, A.; LUSTBADER, J. W.; CANFIELD, R. E.; MACHIN, K. J.; MORGAN, F. J.; ISAACS, N. W. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature**, v. 369, n. 9, p. 455-461, 1994.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature reviews**, v. 7, p. 21-39, 2008.

LEGAN; KARSH. Neuroendocrine regulation of the oestrous cycle and seasonal breeding of the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 74-85, 1979.

LETELIER, C.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GARCIA-PALENCIA, P.; GONZALES-BULNES, A.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R. A.; SANCHEZ, M. A.; SANCHEZ, B.; FLORES, J. M. Progestogen treatments for cycle management in a sheep model of assisted conception affect the growth patterns, the expression of luteinizing hormone receptors, and the progesterone secretion of induced corpora lutea. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1308-1315, 2010.

LETELIER, C. A.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R. A.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J. A. F.; FLORES, J. M.; GONZALEZ-BULNES, A. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. **Theriogenology**, v. 71, n.4, p. 676 - 682, 2009.

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

LINCOLN, G. A. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 203-217, 1992.

LUTHER, J. S.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; KIRSCH, J. D.; WEIGL, R. M.; KRAFT, K. C.; NAVANUKRAW, C.; PANT, D.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 227 - 231, 2007.

MACHADO, R. **A remoção do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos**. 2005. 198f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MALHADO, C. H. M.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; SOUZA JR., A. A. O.; SARMENTO, J. L. R. Growth curves in Dorper sheep crossed with the local Brazilian breeds, Morada Nova, Rabo Largo, and Santa Inês. **Small Ruminant Research**, v. 84, n. 1-3, p. 16-21, 2009.

MARTINEZ-CHEQUER, J. C.; STOUFFER, R. L.; HAZZARD, T. M.; PATTON, P. E.; MOLSKNESS, T. A. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1112-1118, 2003.

MAUREL, M. C.; ROY, F.; HERVÉ, V.; BERTIN, J.; VAIMAN, D. Immune response to equine chorionic gonadotropin used for induction of ovulation in goats and ewes. **Gynecology Obstetric Fertility**, v. 31, p. 766-769, 2003.

MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; GARÓFALO, E. G.; CARLSSON, M. A.; LUNDEHEIM, N.; RUBIANES, E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 β . **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 79-90, 2001.

MENCHACA, A.; MILLER, V.; GIL, J.; PINCZAK, A.; LACA, M.; RUBIANES, E. Prostaglandin F2 α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. **Reproduction Domestic Animal**, v. 39, p.352-355, 2004.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16,n. 4, p. 403 - 413, 2004.

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

MENEGATOS, J. C., S.; KALOGIANNIS, T.; KOUSKOURA, T.; KOUIMTZIS, S. Endocrine events during the peri-estrous period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization. **Theriogenology**, v. 59, p. 1533-1543, 2003.

MISHRA, S.; LEI, Z. M.; RAO, C. V. A novel role of luteinizing hormone in the embryo development in cocultures. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1455-1462, 2003.

MOCK, E. J.; NISWENDER, G. D. Differences in the rate of internalization of ¹²⁵I-labeled human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, and epidermal growth factor by ovine luteal cells. **Endocrinology**, v. 113, p. 259, 1983.

MOOR, R. M.; OSBORN, J. C.; CROSBY, I. M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 167-172, 1985.

NEPHEW, K. P.; CARDENAS, H.; MCCLURE, K. E.; OTT, L. T.; BAZER, F.; POPE, W. F. Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 453-458, 2006.

NEPHEW, K. P.; CARDENAS, H.; MCCLURE, K. E.; OTT, T. L.; BAZER, F. W.; POPE, W. F. Effects of administration of human chorionic gonadotrophin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 453-458, 1994.

NETT, T.; FLORES, J.; CARNEVALI, F.; KILE, J. Evidence for a direct negative effect of estradiol at the level of the pituitary gland in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 554-558, 1990.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 33-42, 2002.

NEVES, J. P.; RAMOS, A. A.; SILVA, B. D. M. Alternatives to estrus synchronization and superovulation in ewes in the tropics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 24, 2010, Porto de Galinhas -PE: Anais... **Acta Scientiae Veterinariae**, v.24, p. 337-369.

NISWENDER, G. D.; REIMERS, T. J.; NETT, T. M. Blood flow: A mediator of ovarian function. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 64, 1976.

NISWENDER, G. D.; SCHWALL, R. H.; FITZ, T. A.; FARIN, C. E.; SAWEYR, H. R. Regulation of luteal function in domestic ruminant. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 41, p. 101, 1985.

PAES DE BARROS, M. B. **Estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de cios com o uso de um novo dispositivo de liberação sustentada de progesterona, associado ou não ao eCG, em ovelhas Santa Inês.**

2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PAKARAINEN, T.; AHTIAINEN, P.; ZHANG, F.-P.; RULLI, S.; POUTANEN, M.; HUHTANIEMI, I. Extragonadal LH/hCG action-Not yet time to rewrite textbooks. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 269, p. 9-16, 2007.

RAMOS, A. K. M.; NEVES, J. P.; MCMANUS, C.; LUCCI, C. M.; CARNEIRO, H. C. R.; AMARAL, R. S. Avaliação dos parâmetros ecográficos de desenvolvimento gestacional de ovinos da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 537 - 543, 2007.

RAO, C. V.; LEI, Z. M. The past, present and future of nongonadal LH/Hcg actions in reproductive biology and medicine.review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 269, p. 2-8, 2007.

RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 501-509, 1994.

RAWLINGS, N.C.; BARTLEWSKI, P. M. **Clinical Reproductive Physiology of Ewes**. In: RAWLINGS, N.C.; BARTLEWSKI, P.M. Saunders, 2007. v.2, p.642-645

RAWLINGS; KENNEDY, S. W.; CHANG, C. H.; HILL, J. R.; HENRICKS, D. M. Onset of seasonal anestrus in ewe. **Journal of Animal Science**, v. 44, p. 791-197, 1977.

RAWLINGS, N. C.; COOK, S. J. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. **Animal Reproduction Science**, v. 30, n. 4, p. 289 - 299, 1993.

REYNA, J.; THOMSON, P. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Synchrony of Ovulation and follicular dynamics in Merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding Seasons. **Reproduction Domestic Animal**, v. 42, p. 410-417, 2007.

RICKETS, A. P.; FLINT, A. P. F. Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta. **Journal of Endocrinology**, v. 86, p. 337-345, 1980.

RIZKALLAH, T. E.; GURPIDE, E.; VAN DE WIELE, R. L. Metabolism oh hCG in man. **Journal Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, p. 92, 1969.

ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A. Influence of reproduction status on susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 65-75, 2004.

ROCHE, J. F.; FOSTER, D. L.; KARSCH, F. J.; COOK, B.; DZIUK, P. J. Levels of luteinizing hormone in sera and pituitaries of ewes during the estrous cycle and anestrus. **Endocrinology**, v. 86, p. 568-572, 1970.

RODRIGUES, L. F. D. S.; ARAUJO, A. A.; NUNES, J. F.; MOURA, A. A. A.; MOREIRA, E. P. Sincronização do estro em ovelhas deslanadas: efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina sobre a taxa de ovulação. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, p. 215-222, 2004.

ROELOFS, J. B.; BOUWMANA, E. G.; DIELEMANB, S. J.; VAN EERDENBURGB, F. J. C. M.; KAAL-LANSBERGENC, L. M. T. E.; SOEDEA, N. M.; KEMPA, B. Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 1337-1352, 2004.

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

ROY F; COMBES B; VAIMAN D; CUIBIU EP; POBEL T; DELETANG F; COMBARNOUS Y; GUILLOU F; MC., M. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 209-218, 1999.

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

SASA, A.; TESTON, D. C.; RODRIGUES, P. D. A.; COELHO, L. D. A.; SCHALCH, E. 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.

SCHMITT, E. J.; BARROS, C. M.; FIELDS, A.; FIELDS, M. J.; DIAZ, J.; KLUGE, M.; THATCHER, W. W. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotrophin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1915-1929, 1996.

SCHRICK, F. N.; SURFACE, R. A.; PRICHARD, J. Y.; DAILEY, R. A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1133-1140, 1993.

SEEKALLU, S. V.; TOOSI, B. M.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D. M. W.; DAVIES, K. L.; WALDNER, C.; RAWLINGS, N. C. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. **Theriogenology**, v. 73, p. 670-680, 2010

SEEKALLU, S. V.; TOOSI, B. M. T.; RAWLINGS, N. C. LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 1-16, 2009.

SHABANKAREH, H. K.; HABIBIZAD, J.; SARSAIFI, K.; CHEGHAMIRZA, K.; KAZEMEIN JASEMI, V. The effect of the absence or presence of a corpus luteum on the ovarian follicular population and serum oestradiol concentrations during the estrous cycle in Sanjabi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 180-185, 2010.

SHABANKAREH, H. K.; HABIBIZAD, J.; TORKI, M. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 362-369, 2009.

SIANANGAMA, P. C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 577-584, 1992.

SILVA, C. J.; COSTA, L. L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. **Theriogenology**, v. 64, p. 49-60, 2005.

SILVIA, W. J.; NISWENDER, G. D. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. III Differences between pregnant and no pregnant ewes in luteal responsiveness to prostaglandin F₂alpha. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 756-764, 1984.

SIMPLÍCIO, A. A. Caprinocultura e ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 27-36, 2011.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 2, p. 916-925, 1990.

SONG, G.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Differential Expression of Cathepsins and Cystatin C in Ovine Uteroplacental Tissues. **Placenta**, v. 28, p. 1091-1098, 2007.

SOUZA, C. J.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. **Journal Reproduction Fertility**, v. 108, p. 101-106, 1996.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 537-550, 2004.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. P. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 65-78, 2007.

STOCK, A. E. F., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.

SUNDBY, A.; TORJENSEN, P. A. Plasma levels of testosterone in bulls response to repeated hCG injections. **Acta Endocrinology**, v. 88, p. 787, 1978.

THATCHER, W. W.; DRIANCOURT, M. A.; TERQUI, M.; BADINGA, L. Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, p. 223-234, 1991.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p. 75-89, 2001.

TOMASINI, A. Santa incerteza: Jornal **Agrovalor**. Fortaleza, 2010. 49, p. 3.

TOOSI, B. M.; SEEKALLU, S. V.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C. Evaluation of the ultrasound image attributes of developing ovarian follicles in the four follicular waves of the interovulatory interval in ewes. **Theriogenology**, v. 116, n. 1-2, p. 73-84, 2009.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; MELO, W. O.; ELIAS, A. K. S.; RODRIGUES, L. S.; PENTEADO, L.; BARUSELLI, P. S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 53-58, 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, 1999.

VALENTIM, R. **Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona usados em inseminação artificial em tempo**. 2004. 88f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**.p.4, março, 2010.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, p. 993 - 1004, 2001.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Estocolmo, **Anais...**, Estocolmo: ICAR, 2000.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. 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, 1999.

WALKER, S. K.; SAITH, D. H.; GODFREY, B.; SEAMARK, R. F. Time of ovulation in the south australian Merino ewe following synchronization of estrus. 1. variation within and between flocks. **Theriogenology**, v. 31, p. 545-553, 1989.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; RANDEL, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WEEMS, Y. S.; KIM, L.; HUMPREYS, V.; TSUDA, V.; BLANKFEIN, R.; WONG, A.; WEEMS, C. W. Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy-specific protein B (PSPB), or arachidonic acid (AA) on secretion of progesterone and prostaglandins (PG) E (PGE; PGE1 and PGE2) and F2alpha (PGF2alpha) by ovine corpora lutea of the estrous cycle or pregnancy in vitro. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 84, p. 163-173, 2007.

WEEMS, Y. S.; NETT, T. M.; RISPOLI, L. A.; DAVIS, T. L.; JOHNSON, D. L.; UCHIMA, T.; RANEY, A.; LENNON, E.; PANG, J.; HARBERT, T.; BOWERS, G.; GOTO, K.; ONG, A.; TSUTAHARA, N.; RANDEL, R. D.; WEEMS, C. W. Prostaglandin E1 (PGE1), but not prostaglandin E2 (PGE2), alters luteal and endometrial luteinizing hormone (LH) occupied and unoccupied LH receptors and mRNA for LH receptors in ovine luteal tissue to prevent luteolysis. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 91, p. 42-50, 2010.

WEEMS, Y. S.; VINCENT, D.; TANAKA, Y. Effects of prostaglandins F2alpha on sources of progesterone and pregnancy in intact, ovariectomized, and hysterectomized 90-100 day pregnant ewes. **Prostaglandins**, v. 43, p. 203-222, 1992.

WHEATON, J. E.; CARLSON, K. M.; WINDELS, H. F.; JOHNSTON, L. J. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 127-141, 1993.

WU, D.; BARRETT, D. M. W.; RAWLINGS, N. C.; GIFFIN, J. L.; BARTLEWSKI, P. M. Relationships of changes in ultrasonographic image attributes to ovulatory and steroidogenic capacity of large antral follicles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 73-84, 2009.

WULL, C.; DICKSON, S. E.; DUNCAN, W. C.; FRASER, H. M. Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by hCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. **Human Reproduction**, v. 16, p. 2515-2524, 2001.

WURST, A. K.; DIXON, A. B.; INSKEEP, E. K. Lack of effect of transrectal ultrasonography with restraint on lambing rate and prolificacy in ewes. **Theriogenology**, v. 68, p. 1012-1016, 2007.

YEN, S. S. C.; LITTLE, L. B.; PEARSON, O. H. Disappearance rates of endogenous luteinizing hormone and chorionic gonadotropin in man. **Journal Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, p. 1763, 1968.

ZAMIRI, M. J.; HOSSEINI, M. Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and phenobarbital on the reproductive performance of fat-tailed Ghezel ewes. **Small Ruminant Research**, v. 30, p. 157-216, 1998.

ZELEKE, M.; GREYLING, J. P. C.; SCHWALBACH, L. M. J.; MULLER, T.; ERASMUS, J. A. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 47-53, 2005.

ZIECIK, A. J.; KACZMAREK, M. M.; BLITEK, A.; KOWALCZYK, A. E.; LI, X.; RAHMAN, N. A. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. Review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 269, p. 51-60, 2007.