

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Viabilidade do uso de associação gonadotrópica para indução de
ciclicidade em ovelhas fora da estação reprodutiva**

Jennifer Hauschildt Dias

Pelotas, 2018

Jennifer Hauschildt Dias

**Viabilidade do uso de associação gonadotrópica para indução de
ciclicidade em ovelhas fora da estação reprodutiva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Carine Dahl Corcini

Coorientador: Bernardo Garziera Gasperin

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D541v Dias, Jenniffer Hauschildt

Viabilidade do uso de associação gonadotrópica para indução de ciclicidade em ovelhas fora da estação reprodutiva / Jenniffer Hauschildt Dias ; Carine Dahl Corcini, orientadora ; Bernardo Garziera Gasperin, coorientador. — Pelotas, 2018.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Contra-estação reprodutiva. 2. Crescimento folicular. 3. Ovelhas. 4. Protocolo hormonal. 5. Reprodução. I. Corcini, Carine Dahl, orient. II. Gasperin, Bernardo Garziera, coorient. III. Título.

CDD : 636.3

Jennifer Hauschildt Dias

Viabilidade do uso de associação gonadotrópica para indução de ciclicidade
em ovelhas fora da estação reprodutiva

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carine Dahl Corcini (Orientador)
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Jórgea Pradiée
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eliza Rossi Kominou
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Pelotas

Dedicatória

Aos meus pais e minha irmã, que foram os primeiros e melhores mestres que eu tive e à Vladinis (*in memorian*), que sempre me incentivou a ir mais longe e acreditar em mim mesma, a quem devo grande parte do que sei e sou hoje, e que lá de cima sei que está muito feliz com esta conquista.

Esta é por e para vocês!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida maravilhosa que tenho.

Aos meus pais Francisco e Janice e irmã Ellen, pelo amor e apoio incondicional e que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos.

À minha família, que sempre torceu por mim e se fez presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Vladinis (*in memorian*), a quem serei eternamente grata por tudo que me ensinou, pela amizade e companheirismo que tivemos e por ter sempre me apoiado e incentivado a ser melhor, como pessoa e profissional. “Auu”, esta é pra ti benzinho.

À família Oliveira Miranda, minha família do coração, pela torcida e apoio nestes anos de convivência e pela amizade que construímos. Um agradecimento especial ao Sr. Vlads Miranda, pela contribuição no presente estudo.

Aos meus amigos de Rio Grande e Pelotas, minha segunda família, a quem sempre pude recorrer nos momentos de alegria ou estresse, e sempre ofereceram um ombro amigo e a parceria, para falar de coisas sérias e de bobagens.

Ao grupo Repropel, professores, pós-graduandos e estagiários, pelo ensinamento transmitido desde a época de estágio, o companheirismo dos dias de convívio e a ajuda na execução deste trabalho.

Aos meus orientadores, Carine e Bernardo, pelo apoio, confiança e orientação durante estes anos e por sempre estarem de portas abertas para me receber.

À Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel.

À CAPES e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro concedido.

À todos que compartilharam um pouquinho desta trajetória comigo e que contribuíram, direta ou indiretamente, para eu chegar até aqui.

Meu mais sincero muito obrigada a todos, de coração!!

***“É bom olhar pra trás e admirar a vida que soubemos fazer...
É bom olhar pra frente...”***

Resumo

DIAS, Jenniffer Hauschildt. **Viabilidade do uso de associação gonadotrópica para indução de ciclicidade em ovelhas fora da estação reprodutiva.** 2018.64f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A associação de progestágeno e gonadotrofina coriônica equina (P4-eCG) é o protocolo melhor estabelecido na espécie ovina para sincronização de estro. Este protocolo tem as melhores taxas de prenhez obtidas tanto com cruzamento por monta natural como por inseminação artificial, e ainda pelos benefícios agregados ao ciclo reprodutivo, principalmente quando há utilização do eCG. No entanto, o eCG não se encontra disponível isoladamente para venda em todos os países, sendo então necessário a utilização de um produto comercial de associação gonadotrófica (eCG+hCG). Em ovinos, há poucos estudos envolvendo os efeitos da adição de hCG em protocolo de indução à ovulação, principalmente comparando ao uso de eCG isolado. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um protocolo P4-eCG+hCG, frente ao protocolo convencional P4-eCG e P4 isolado, para indução de estro e ovulação em cordeiras pré-púberes durante o anestro estacional, com base na hipótese de que o hCG associado ao eCG promoveria melhora nos parâmetros reprodutivos. No primeiro experimento, 18 fêmeas ovinas na contra-estação reprodutiva foram submetidas aos seguintes protocolos: dispositivo intravaginal impregnado com MAP (DIV) por 12 dias (MAP; n=63), DIV por 12 dias associado à 400UI de eCG na retirada do dispositivo (eCG; n=6) ou DIV por 12 dias associado à 400UI eCG e 200UI hCG (eCG+hCG; n=6) na retirada do dispositivo; para avaliação do desenvolvimento folicular, sendo observado um maior crescimento folicular nos grupos tratados com gonadotrofinas em comparação ao MAP ($P < 0,05$). Os níveis de progesterona nove dias após os tratamentos foram superiores no eCG+hCG em comparação aos demais grupos. Posteriormente, 66 cordeiras pré-púberes foram submetidas aos mesmos tratamentos do experimento 1 e exposição à monta natural com carneiros. A taxa de manifestação de estro foi superior em eCG (88,5%; 23/26) e eCG+hCG (85,2%; 23/27), em comparação ao MAP (33,3%; 4/12; $P < 0,05$). A taxa de prenhez foi superior no eCG (34,6%; 9/26) em relação ao MAP (0%; 0/13; $P < 0,05$) e intermediária no grupo eCG+hCG (18,6%; 5/27). Os níveis de progesterona sérica não diferiram entre os grupos eCG e eCG+hCG, sendo observado apenas um efeito do momento. Coletivamente, os resultados sugerem que a associação de eCG+hCG não traz benefícios em relação ao uso de eCG isoladamente.

Palavras-chave: contra-estação reprodutiva; crescimento folicular; ovelhas; protocolo hormonal; reprodução.

Abstract

DIAS, Jenniffer Hauschildt. **Viability of the use of the gonadotrophic association for the induction of cyclicity in ewes outside the reproductive season.** 2018. 64f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The association of progestogen and equine chorionic gonadotrophin (P4-eCG) is the best established protocol in the ovine species for estrus synchronization. This protocol has the best pregnancy rates obtained with both natural mating and artificial insemination, as well as the added benefits to the reproductive cycle, especially when using eCG. However, the eCG is not available alone for sale in all countries, so a commercial gonadotrophic association product (eCG + hCG) is required. In sheep, there are few studies involving the effects of adding hCG on ovulation induction protocol, specially comparing to the use of eCG alone. The objective of this study was to evaluate the efficacy of a P4-eCG+hCG protocol, compared to the conventional protocol P4 and P4-eCG alone, for induction of estrus and ovulation in prepubertal sheep during seasonal anestrous, based on the hypothesis that hCG associated with eCG would promote improvement in reproductive parameters. In a first experiment, 18 ewes were submitted to the following protocols: intravaginal device (DIV) containing medroxyprogesterone acetate (MAP) for 12 days (MAP; n = 13); 12-day DIV associated with 400IU eCG at DIV withdrawal; n = 26) or DIV for 12 days associated with 400IU eCG and 200IU hCG (eCG + hCG; n = 27) at DIV withdrawal. (n = 6 / group), and a greater follicular growth was observed in the groups treated with gonadotrophins compared to MAP alone (P <0.05). Progesterone levels nine days after treatments were higher in eCG + hCG compared to the other groups. Subsequently, 66 prepubertal ewes were submitted to the same treatments of experiment 1 and exposure to natural mounts with sheep. The rate of estrus manifestation was higher in eCG (88.5%, 23/26) and eCG + hCG (85.2%, 23/27), compared to MAP (33.3%, 4/12; P <0.05). The pregnancy rate was higher in eCG (34.6%, 9/26) than in MAP (0%, 0/13, P <0.05) and intermediate in the eCG + hCG group (18.6%; / 27). Serum progesterone levels did not differ between the eCG and eCG + hCG groups, with only one effect observed at the time. Collectively, the results suggest that the association of eCG + hCG does not bring benefits in relation to the use of eCG alone.

Keywords: ewes; follicular growth; hormonal protocol; reproduction; out-of-breeding season.

Lista de Figuras

Artigo 2

- Figura 1 Taxa de crescimento folicular em ovelhas submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro estacional..... 39
- Figura 2 Concentração sérica de estradiol (pg/mL) no D2 em ovelhas submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro estacional..... 40
- Figura 3 Concentração sérica de progesterona (ng/mL) no D9 em ovelhas submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro estacional..... 41
- Figura 4 Taxa de manifestação de estro de cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27), durante o anestro estacional..... 41
- Figura 5 Manifestação estral cumulativa observada em um período de 120h de cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27), durante o anestro 43

	estacional.....	
Figura 6	Taxa de prenhez de cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27), durante o anestro estacional.....	44
Figura 7	Nível de progesterona sérica (ng/mL) nos dias D9 e D14 observada em cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27), durante o anestro estacional.....	44

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Taxa de estro, intervalo de início de estro, taxa de ovulação, momento da ovulação e taxa de prenhez em protocolos a base de progesterona associado ou não a gonadotrofina.....	24
Tabela 2	Taxas de estro, intervalo de início de estro, taxa de ovulação, intervalo de início de ovulação e taxas de prenhez em protocolos a base de prostaglandina F2 α	26

Artigo 2

Tabela 1	Taxa de ovulação e diâmetro máximo pré-ovulatório de ovelhas submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro estacional.....	40
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CIDR	Controlled Internal Drug Release
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CL	Corpo lúteo
DICO	Dispositivo Intravaginal Caprino e Ovino
DIV	Dispositivo intravaginal
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição corporal
ECG	Gonadotrofina coriônica equina
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FGA	Acetato de fluorogestona
FSH	Hormônio folículo estimulante
GNRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
P4	Progesterona
PGF2A	Prostaglandina F2 α
RPM	Rotações por minuto
TETF	Transferência de embrião em tempo fixo

Lista de Símbolos

<	Menor
≤	Menor ou igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
=	Igual
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
A	Alfa
B	Beta
%	Porcentagem
½	Metade
D	Dias
G	Gramas
H	Horas
Kg	Quilogramas
Mg	Miligramas
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
Ng	Nanograma
Pg	Picograma
UI	Unidades internacionais

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Artigos.....	19
2.1 Artigo 1.....	19
2.2 Artigo 2.....	33
3 Considerações Finais.....	51
Referências.....	53
Anexos.....	63

1 Introdução

A ovinocultura está intimamente ligada à cultura do ser humano. Os ovinos foram uma das primeiras espécies domesticadas pelo homem, devido a sua dupla aptidão, tanto para produção de alimentos (carne e leite), quanto para proteção (lã e pele). A produção está amplamente difundida no território mundial, justificada pela grande capacidade de adaptação da espécie à climas, relevos e vegetações diferentes (Viana, 2008). Os maiores rebanhos concentram-se principalmente na China e Austrália, que ocupam o primeiro e segundo lugar, respectivamente, enquanto o Brasil se encontra em 18º lugar no ranking mundial de rebanho ovino (FAO, 2016).

A grande adaptabilidade da espécie favorece sua criação no Brasil, demonstrando ser uma forte alternativa para pequenos, médios e grandes produtores rurais, com sistemas de manejo simples ou complexos (Viana *et al*, 2013). Segundo o IBGE, em 2015 o rebanho nacional continha 17,6 milhões de cabeças, sendo 57,5% na região Nordeste e 29,3% na região Sul. No Rio Grande do Sul, a produção ovina tinha grande destaque no início do século XX, principalmente pelo mercado da lã, tornando este estado grande produtor ovino. No entanto, a crise da lã enfrentada entre as décadas de 80 e 90 fez muitos produtores mudarem o foco da produção, reduzindo o rebanho ovino drasticamente (Silva *et al*, 2013). Atualmente, a atividade apresenta ascensão na produção e comercialização com foco na produção de carne, favorecida pelo aumento do poder aquisitivo e do consumo pela população urbana.

Em contrapartida, apesar do aumento de produção no cenário nacional, a produção ainda não é suficiente para suprir a demanda existente. Segundo Viana *et al* (2013), a ovinocultura apresenta-se limitada pela sazonalidade reprodutiva, baixas taxas de natalidade, roubo e abate clandestino e informal de animais, além de faltar incentivo ao consumo da carne, tornando a cadeia produtiva desestruturada. Ademais, o mercado ainda sofre com a competitividade, principalmente de países mais tecnificados (Viana, 2008). O aumento das importações de carne ovina, principalmente oriunda do Uruguai, enfraquece nosso sistema de produção, que

ainda apresenta carne de baixa qualidade, alto custo e baixa escala de produção, além da oferta sazonal do principal produto, o cordeiro.

A demanda de carne ovina pode ser suprida com abordagens mais organizadas de manejo e associação da produção ao uso de biotecnologias que permitem a manipulação do ciclo estral, pois oferecem otimização dos processos do sistema produtivo capazes de gerar retornos diretos e indiretos para produtores e técnicos (Malheiros *et al*, 2017). As vantagens da utilização de protocolos de sincronização nos sistemas de produção ovina incluem a concentração dos manejos reprodutivos, do momento do estro e da ovulação, permitindo a maior difusão de uma genética de interesse e redução dos custos com mão de obra, e, em casos de animais em anestro estacional, a desestacionalização reprodutiva. Ainda, há a possibilidade de incremento de ovulações múltiplas, assim como o estabelecimento de sistemas de produção com mais de um ciclo anual. Outro importante reflexo dos manejos de sincronização é a adequação dos manejos nutricional e sanitário para o periparto, momento crítico para o sistema. Além disso, propicia a utilização de outras biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a superovulação e a transferência de embriões em tempo fixo (TETF), que maximizam a performance reprodutiva da fêmea, agregando valor genético ao rebanho.

Os ovinos são animais poliéstricos sazonais, com característica marcante influenciada pela raça, incidência luminosa ou nutrição. O fenômeno de fotoperíodo, observado principalmente em regiões de latitudes elevadas, se refere ao estímulo para manifestação das características reprodutivas decorrente da diminuição da luminosidade (Hafez & Hafez, 2004). Diante disso, a atividade reprodutiva destes animais é dividida em três momentos: acasalamento (final do verão ao início do inverno), anestro (início do inverno ao início do verão) e transição (verão). Espécies lanadas, difundidas principalmente no sul do país, sofrem maior interferência do fotoperíodo em comparação com as raças deslanadas, presentes principalmente no nordeste brasileiro, que por sua vez apresentam ciclicidade durante todo o ano, condicionada à fatores climáticos e nutricionais (Fonseca, 2005).

O equilíbrio nutricional influi diretamente na atividade reprodutiva, onde a baixa condição corporal, associada ou não à redução da oferta de nutrientes, determina atraso ou supressão do estro, com diminuição dos parâmetros de fertilidade (Robinson *et al*, 2006).

O anestro estacional é consequência de uma mudança no mecanismo de feedback positivo do estradiol (E2) no eixo hipotalâmico-hipofisário, resultando na supressão da cascata de ovulação (Viu *et al*, 2006). Os sinais luminosos são captados pelos fotorreceptores dos olhos, transmitidos via sistema nervoso para glândula pineal, a qual irá converter o sinal nervoso em sinal hormonal, acarretando em um ritmo circadiano de secreção de melatonina. Quando o período de escuridão (noite) for maior que o de luminosidade (dia), terá um aumento da secreção de melatonina, fator determinante na fisiologia reprodutiva da ovelha, que vai causar sensibilização do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ao estrogênio, aumentando a amplitude dos pulsos do hormônio luteinizante (LH) (Moraes *et al*, 2002). Desta forma, as variações do fotoperíodo controlam os padrões endócrinos, ovulatórios e comportamentais dos ovinos, sendo o efeito proporcional à latitude em que os animais se encontram.

O início da atividade reprodutiva na fêmea é estimulado pelos efeitos hormonais, marcada pelo crescimento folicular, demonstração de estro e ovulação. Nesta espécie, a puberdade é atingida quando o animal atinge 50 a 70% do peso adulto, entre os 6 a 9 meses de idade. Diferentemente da vaca, os sinais de estro na fêmea ovina são pouco evidentes. Pode ocorrer edemaciação da vulva, procura e aceitação do macho, e o sinal mais característico é o deixar-se montar pelo carneiro (Granados *et al*, 2006). A duração é entre 24 a 48 horas, sendo a média de 30h, e a ovulação ocorre próxima ao fim do estro, aproximadamente 24 a 27h após o início do estro. Em ovinos é comum ocorrer múltiplas ovulações, dependente de fatores como raça, idade, peso, condição corporal e genótipo (Hafez & Hafez, 2004).

Assim como em bovinos, na ovelha o desenvolvimento folicular se apresenta em ondas, com uma média de três ondas a cada ciclo ovulatório (Evans, 2000). No período de transição, onde os ciclos podem ser mais longos ou mais curtos que durante a estação reprodutiva, o número de ondas pode variar (Ginther *et al*, 1995). Além disso, animais em boas condições nutricionais apresentam maior número de ondas por ciclo (Viñoles *et al*, 1999). Em geral, o ciclo em ovinos possui 17 ± 2 dias, dividido em duas fases: a fase luteal, com duração de 13 dias, e fase folicular, com 4 dias de duração (Rubianes *et al*, 2003). A cada onda folicular, pelo menos um folículo deve atingir diâmetro ≥ 5 mm, o qual, se for o maior folículo no momento da luteólise, será ovulado (Menchaca *et al*, 2004).

O ciclo estral é regulado por uma série de mecanismos neuroendócrinos. Através do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), o sistema nervoso central irá estimular a síntese e secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise. Estes hormônios atuarão no estímulo esteroidogênico dos ovários, promovendo o crescimento folicular e ovulação (Chemineau *et al*, 2008). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, têm-se o início da atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de andrógenos, cujo aumento da atividade aumenta a sensibilidade do folículo ao FSH (Scaramuzzi *et al*, 1993) resultando em um padrão de crescimento folicular. Quanto maior a atividade do FSH sobre a aromatase, maior a secreção de estradiol folicular (Viñoles *et al*, 2001). Falhas na manutenção da aromatase, como deficiência da secreção de FSH, resultam na diminuição de estradiol e atresia folicular (Scaramuzzi *et al*, 1993). Folículos com diâmetro > 4mm, ou seja, os folículos dominantes ou ovulatórios, possuem habilidade de superar os estágios finais da maturação folicular sem sofrerem atresia.

A secreção de GnRH atua em todas as fases reprodutivas da ovelha, gerando pulsos rítmicos de LH (Karsch *et al*, 1997). O pico de LH induz à ovulação do folículo pré-ovulatório e luteinização das estruturas foliculares remanescentes, com posterior formação do corpo lúteo (CL). Enquanto este se desenvolve, aumentam as secreções do hormônio progesterona (P4) que inibe a secreção uterina de prostaglandina F2 α (PGF2 α), impedindo assim a lise do CL, suprimindo a frequência dos pulsos de GnRH e, conseqüentemente, a secreção de LH. O aumento dos níveis de P4 sérico atinge um platô por volta do dia 6 (fase lútea) e se mantém até aproximadamente o dia 10 do ciclo, quando ocorre a luteólise induzida pela PGF2 α (Viu *et al*, 2006, Bartlewski *et al*, 2011).

A luteólise é resultado de um processo de retroalimentação positiva ocitocina luteal-PGF2 α endometrial, que resulta com a lise do CL. Neste momento, os níveis de P4 sofrem uma queda brusca, que vai permitir o aumento dos pulsos de GnRH e conseqüentemente de LH, com posterior estímulo da secreção de estradiol pelo ovário. Durante a fase folicular, o aumento de estradiol diminui as concentrações de FSH, prevenindo crescimento e maturação folicular. Este rápido aumento das concentrações de estrógeno estimula o comportamento de manifestação estral, e desencadeia a liberação de GnRH e LH, provocando a ovulação, luteinização e redução da liberação de estradiol, iniciando um novo ciclo (Rubianes *et al*, 2003;

Bartlewiski *et al*, 2011)

Levando em consideração a fisiologia reprodutiva e pensando em alternativas eficazes de aumento de produtividade, a sincronização de estro é uma das principais ferramentas de manejo reprodutivo utilizadas, capaz de promover um aumento da produção e, quando associada à IA, promove um melhoramento genético considerável no rebanho. Além disso, ela propicia a concepção fora da estação reprodutiva, aumentando a prolificidade, antecipando a puberdade e reduzindo o número de serviços por concepção (Machado & Simplício, 2001). Existem diversos meios para manipular o ciclo estral da fêmea ovina, podendo ser classificados em “naturais” e “farmacológicos”. Os primeiros têm menor custo, porém apresentam como desvantagem a falta de precisão do estro e ovulação, além de ter uso limitado a épocas do ano em que o fotoperíodo é mais favorável (Dias *et al*, 2000). Dentre os manejos naturais podemos citar: a alteração do fotoperíodo, submetendo as fêmeas a 16h de luz e 8h de escuro durante 60 dias; a suplementação energética da alimentação (“*flushing*”); e a introdução de machos reprodutores em rebanho previamente isolados (efeito macho) (Fonseca *et al*, 2005; Martin *et al*, 2004). Já os métodos farmacológicos utilizam a administração de hormônios que, apesar do custo elevado, possuem como vantagem a possibilidade de utilização independente do período reprodutivo da fêmea (Gonçalves *et al*, 2001). Ademais, permitem determinar com precisão o momento da ovulação, permitindo a utilização da IA (Dias *et al*, 2000). Dentre estes protocolos podemos citar a utilização de melatonina, de progesterona e prostaglandina, associadas ou não à gonadotrofinas.

Dentre as gonadotrofinas utilizadas, destaca-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG), que é capaz de se ligar a receptores de FSH e LH, estimulando o crescimento folicular e uma maior sincronia da ovulação, quando administrada no final do período de suplementação com progestágenos. Ainda, a associação de eCG e gonadotrofina coriônica humana (hCG), é utilizada em alguns países onde o eCG não é disponível comercialmente. A hCG tem maior afinidade aos receptores de LH, o que sugere que a associação de eCG e hCG poderia induzir um maior crescimento folicular, melhor sincronia da ovulação e maior produção de progesterona pelos corpos lúteos, especialmente em animais fora da estação reprodutiva (que apresentam deficiência de LH). Entretanto, poucos estudos investigaram o efeito da associação de eCG e hCG em ovinos e, até o presente momento, não é possível concluir se a associação das gonadotrofinas é superior em comparação à utilização

de eCG isoladamente. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: 1) revisar as principais abordagens hormonais para controle do ciclo em ovinos; 2) testar a hipótese de que a associação de eCG e hCG é superior na indução da ciclicidade em cordeiras pré-púberes fora da estação rep*-rodutiva.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Manipulação hormonal do ciclo estral em ovinos: uma revisão

Jenniffer Hauschildt Dias, Vladinis Oliveira Miranda†, Fernando Caetano de Oliveira, Bernardo Garziera Gasperin, Carine Dahl Corcini

Artigo publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal
Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.40, n.2, p.628-633, abr/jun. 2017.
Disponível em www.cbra.org.br – Recebido: 13 de dezembro de 2016 – Aceito: 5 de julho de 2017.

Manipulação hormonal do ciclo estral em ovinos: uma revisão
Hormonal manipulation of the estrous cycle in sheep: a review

Jenniffer Hauschildt Dias, Vladinis Oliveira Miranda†, Fernando Caetano de Oliveira, Bernardo Garziera Gasperin, Carine Dahl Corcini¹

Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Reprodução Animal (Repropel), Pelotas, RS, Brasil.

¹Correspondência: corcinicd@gmail.com

Resumo

O consumo de carne ovina no Brasil tem apresentado aumento expressivo, mas sem oferta suficiente para atender a demanda gerada. Visto os entraves reprodutivos na espécie, buscam-se alternativas de manejo que possam incrementar sua eficiência, como a associação de protocolos de sincronização e indução de estro/ovulação. Embora os mais utilizados sejam protocolos a base de prostaglandina F_{2α} (PGF) ou progesterona, a associação com gonadotrofinas tem sido avaliada e demonstra aumento nas taxas reprodutivas. Objetivou-se com este artigo rever os protocolos de sincronização utilizados em ovinos e discutir estratégias para incremento da produção.

Palavras-chave: ciclo estral, ovinocultura, reprodução.

Abstract

The consumption of sheep meat in Brazil has presented a significant increase, but there is no enough product in the market to meet this demand. Considering the reproductive obstacles in the species, alternatives of reproductive management that increase its efficiency, such as the association of synchronization protocols and estrus induction, are sought. Although the most commonly used are prostaglandin or progesterone-based protocols, their association with gonadotrophins has been

evaluated and allows an increase in reproductive rates. The objective of this article was to review the synchronization protocols used in the species and to discuss strategies to increase production.

Keywords: *estrous cycle, reproduction, sheep farming.*

Introdução

O Brasil tem demonstrado, nos últimos anos, um aumento considerável na demanda por carne ovina, resultado da valorização da carne em mercados onde até então havia baixo consumo. Apesar do aumento do número de animais (IBGE, 2017), o rebanho, que em 2013 era de 17,3 milhões de cabeças (FAO, 2014), não consegue suprir a produção interna, não só devido ao número insuficiente de animais, como também devido a ineficiência reprodutiva e produtiva observada, que agravam o déficit existente. O uso de biotecnologias que permitem a manipulação do ciclo estral surge neste cenário buscando otimizar processos do sistema produtivo capazes de gerar retornos diretos e indiretos para produtores e técnicos.

As vantagens da utilização de protocolos de sincronização nos sistemas de produção ovina incluem a concentração dos manejos reprodutivos, do momento do estro e da ovulação, permitindo a maior difusão de uma genética de interesse. Ainda, há a possibilidade de incremento de ovulações múltiplas, assim como o estabelecimento de sistemas de produção com mais de um ciclo anual. Outro importante reflexo dos manejos de sincronização é a adequação de manejos nutricional e sanitário para o periparto, momento crítico para o sistema. Além disso, propicia a utilização de outras biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a superovulação e a transferência de embriões em tempo fixo (TETF), que maximizam a *performance* reprodutiva da fêmea, agregando valor genético ao rebanho.

O objetivo deste artigo foi rever as principais possibilidades para manipulação hormonal do ciclo estral em ovinos, incluindo protocolos de sincronização e indução de estro e ovulação já estabelecidos e outros mais recentes, sem utilização de esteroides.

Protocolos a base de progesterona e análogos

Métodos que utilizam progesterona (P4) ou seus análogos sintéticos (progestágenos) se baseiam no papel da progesterona na endocrinologia reprodutiva, permitindo o controle da secreção de hormônio luteinizante (LH) (Hansel e Convey, 1983) e supressão do estro durante a estação reprodutiva ou, sensibilizando o eixo hipotálamo/hipófise/gonadal na contra-estação reprodutiva.

Em geral, utiliza-se a via vaginal para suplementação de progestágenos, devido a simplicidade do manejo e devido ao fato de que, no Brasil, apenas dispositivos intravaginais (DIVs) são comercializados para ovinos. A maioria dos DIVs são compostos por esponjas de poliuretano impregnadas com análogos de progesterona (60 mg de acetato de medroxiprogesterona-MAP ou 30mg de acetato de fluorogestona-FGA) ou dispositivos de silicone contendo 0,33g de progesterona natural. Implantes auriculares contendo 3mg de norgestomet ou até ½ implante auricular (1,5mg de norgestomet), também possibilitam adequada sincronia de estro e ovulação (Blaschi et al., 2014). Ainda, existem relatos da utilização de formulações de progesterona para aplicação via injeções intramusculares (Knights et al., 2011) ou administração oral (Daniel et al., 2001). Entretanto, estas formulações são pouco práticas e não possibilitam um rígido controle dos níveis circulantes em comparação ao uso de implantes.

Os diferentes dispositivos vaginais disponíveis para ovinos são eficientes no controle do ciclo. Entretanto, Santos-Neto et al. (2015) comparando três diferentes DIVs quanto à taxa de prenhez após IATF cervical ou intrauterina com sêmen fresco, realizadas 48 ou 54 h após a remoção do DIV, respectivamente, observaram melhores taxas nas fêmeas tratadas com DIV de silicone (CIDR ou DICO) em comparação aos animais que receberam esponjas (60mg MAP). A menor probabilidade de causar infecções ou aderência, a facilidade de manejo para colocação e retirada, e o custo equivalente ao das esponjas, são vantagens da utilização de dispositivos de silicone (Manes et al., 2014).

Quanto à duração dos protocolos a base de progestágenos, existem protocolos longos (12-14 dias) e protocolos curtos (5-7 dias) (Abecia et al., 2012). Protocolos longos mimetizam o período de permanência do corpo lúteo (CL) no ciclo

estral, sincronizando eficientemente o estro. No entanto, Menchaca e Rubianes (2004) justificam que protocolos curtos (5-7 dias) são suficientes para sincronizar a emergência da onda folicular, que ocorre entre 5-7 dias, não sendo necessário prolongar a fase luteal por maiores períodos. Além disso, em protocolos longos, é relatada maior probabilidade de ovulação de folículos dominantes persistentes (Viñoles et al., 2001), embora a ovulação de folículos mais velhos não influencie a qualidade do embrião em ovinos (Evans et al., 2001).

Em protocolos curtos, recomenda-se uma injeção de PGF prévia ou no momento da retirada dos DIVs, para assegurar a lise do CL e, conseqüentemente, a queda na produção de progesterona, pois a duração do tratamento é menor que a fase luteal do ciclo. Dessa forma, garante-se uma melhor taxa de resposta das matrizes, resultando na ovulação de folículos maiores e mais “novos”. É demonstrado que a administração de PGF no momento da inserção do progestágeno resulta em antecipação do momento de estro após a retirada do implante em comparação à aplicação de PGF simultaneamente a retirada do implante (Martemucci e D’Alessandro, 2011). Durante o anestro sazonal, a duração dos protocolos não difere quanto às taxas de manifestação de cio, ovulação e fertilidade (Ungerfeld e Rubianes, 2002) mas preconiza-se a associação com a gonadotrofina coriônica equina (eCG), o que induz o desenvolvimento de folículos, e a ovulação (Leyva et al., 1998).

A manifestação estral inicia a partir de 48h após a retirada dos DIVs (Abecia et al., 2012), com intervalos menores quando a suplementação de gonadotrofinas é utilizada (Tab. 1). Neste último caso, o momento da ovulação se concentra, em média, 60h após a retirada do DIV (Martemucci e D’Alessandro, 2011). Ungerfeld (2016) observou maior intervalo de início do estro em cordeiras, em comparação a fêmeas multíparas, após protocolo curto e bioestimulação com macho durante o período de anestro estacional.

Tabela 1: Taxa de estro, intervalo de início de estro, taxa de ovulação, momento da ovulação e taxa de prenhez em protocolos a base de progesterona associado ou não a gonadotrofina.

Autor	Protocolo	EST (%)	IIE (h)	OVUL. (%)	IIO (h)	P (%)
Vilariño et al, 2013 (Exp. 1)	PGF2 α + CIDR 1 ^o uso 6d + PGF2 α + 300UI eCG	-	42 \pm 6,4	80	68,3 \pm 5,5	-
	PGF2 α + CIDR 2 ^o uso 6d + 300UI eCG	-	34,7 \pm 1 1,1	90	66 \pm 12,7	-
	PGF2 α + 300UI eCG	-	37,2 \pm 6,8	100	62,4 \pm 5,1	-
Viñoles et al, 2001	60mg MAP 12d	88	49,0 \pm 3,0 ^a	-	-	63 ^b
	60mg MAP 12d + 250UI eCG	90	44,6 \pm 2,5 ^b	-	-	67 ^b
	60mg MAP 6d	95	73,3 \pm 6,5 ^a	-	-	87 ^a
	60mg MAP 6d + 250UI eCG	79	84,8 \pm 7,1 ^a	-	-	58 ^b
Ungerfeld e Rubianes, 2002 (Exp. 1)	60mg MAP 6d + 380UI eCG	94,1	44,6 \pm 1,7 ^a	-	-	-
	30mg MAP 6d + 380UI eCG	91,5	38,8 \pm 1,6 ^b	-	-	-
	CIDR-G [®] 6d + 380UI eCG	95,9	39,9 \pm 2,1	-	-	-
Ungerfeld e Rubianes, 2002 (Exp. 2)	60mg MAP 14d + 350UI eCG	89,7	46,5 \pm 2,4	-	-	-
	60mg MAP 6d + 350UI eCG	82,1	44,9 \pm 2,1	-	--	-
	30mg MAP 14d + 350UI eCG	100	44 \pm 1,8	-	-	-
	30mg MAP 6d + 350UI eCG	86,2	46,5 \pm 2,4	-	-	-
Ungerfeld, 2016	60mg MAP 6d (multíparas)	66,1 ^a	64,9 \pm 3,4 ^a	87,5 ^a	-	59,5
	MAP 6d (nulíparas)	30,3 ^b	77,4 \pm 4,5 ^b	66,7 ^b	-	55

Abreviações: EST: taxa de estro; IIE: Intervalo de início de estro; OVUL: taxa de ovulação; IIO: Intervalo de início da ovulação; P: taxa de prenhez. ^{a,b}indicam diferença ($P \leq 0,05$) entre os valores em cada linha para cada estudo.

Protocolos a base de prostaglandina e análogos

A ação luteolítica da PGF e seus análogos sintéticos, tornou este hormônio uma eficiente ferramenta para sincronização de estro em animais cíclicos. Em comparação a protocolos a base de P4 ou análogos, a PGF oferece vantagens pela rápida metabolização, baixo custo e baixa quantidade de resíduos ambientais em comparação à utilização de DIVs com P4 (Menchaca e Rubianes, 2004). Entretanto,

a PGF só é funcional em animais com presença de corpo lúteo responsivo.

A PGF tem sido utilizada isolada em protocolos (Evans e Maxwell, 1990; Menchaca e Rubianes, 2004), com manifestação de cio em média de 40-50h e ovulações próximo às 70h após administração (Vilariño et al., 2017). Rubianes et al. (2003) demonstram que a ovulação ocorre em, aproximadamente, 60 h quando a dose luteolítica é aplicada nos dias 3-4 pós ovulação, demonstrando que as células luteais já respondem à PGF três dias após luteinização. Entretanto, as taxas de prenhez são variáveis (Tab. 2), consequência de fatores como estado ovariano no momento da administração da PGF, efeito individual, momento da IA, condição corporal e manejo nutricional, associação de indutores de ovulação e doses utilizadas (Menchaca e Rubianes, 2004).

Em protocolos com PGF, foi demonstrado por Fierro et al. (2016) que o tempo de ovulação varia de acordo com o intervalo de aplicações entre as PGF, indicando a necessidade de ajustar os momentos de IA de acordo com a técnica de inseminação. Com isso, Fierro et al. (2017) observaram maiores taxas de prenhez, quando ajustaram o momento da IATF cervical com sêmen fresco em protocolos com intervalos de 12, 14 ou 16 dias entre aplicações. Olivera-Muzante et al. (2011), tentando estabelecer o momento da IA em protocolos com duas aplicações de PGF com 7 dias de intervalo, observaram que a IATF cervical com sêmen fresco às 42h, 48h e 54h após a segunda aplicação, não possibilitou a obtenção de resultados de fertilidade comparáveis ao protocolo padrão utilizando P4 e eCG com IATF 54h após remoção do DIV e aplicação de eCG. Em contrapartida, Menchaca e Rubianes (2004) alegam que protocolos com intervalos de 7 dias promovem melhor sincronização, já que a segunda aplicação de PGF coincide com os dias 3 a 5 pós ovulação, quando o maior folículo ainda está em crescimento.

Tabela 2: Taxas de estro, intervalo de início de estro, taxa de ovulação, intervalo de início de ovulação e taxas de prenhez em protocolos a base de prostaglandina.

Autor	Protocolo	IA	EST. (%)	IIE (H)	OVUL.	IIO (H)	P (%)
Vilariño et al, 2017 (Exp. 1)	1 PGF	-	86,7	38,8 ± 26,9	1,6 ± 0,5	70,2 ± 20,7	-
	2 PGF int. 7 d	-	100	49,2 ± 10,9	1,6 ± 0,5	68,8 ± 7,1	-
Fierro et al, 2016	2 PGF int. 10 d	CS 48h	-	50,0 ± 6,0 ^a	1,44 ± 0,5 ^a	72 ± 6,6 ^a	21,9 ^a
	2 PGF int. 12 d	CS 48h	-	44 ± 4,9 ^a	1,36 ± 0,49 ^a	70 ± 6,2 ^a	21,2 ^a
	2 PGF int. 14 d	CS 48h	-	37,2 ±	1,27 ± 0,45 ^a	58,8 ±	51,5 ^b
	2 PGF int. 16 d	CS 48h	-	23,4 ^a 44 ± 15,9 ^a	1,32 ± 0,48 ^a	21,8 ^a 64 ± 9,0 ^a	30,3 ^{ab}
Contreras-solis et al, 2009 (Exp. 2)	2 PGF int. 9 d + E.M.	-	100	32,4 ± 2,6	-	49,5 ± 3,4 ^c	-
	2 PGF int. 9 d	-	-	-	-	61,1 ± 1,1 ^d	-
Olivera-muzante et al, 2013	2 PGF int. 7d	CS 44h	100 ^a	-	1,22 ^a	-	42,6 ^a
	2 PGF int. 7d+GnRH 24h	CS 44h	97 ^a 99 ^a	-	1,12 ^a	-	10,2 ^b
	2 PGF int. 7d+GnRH 36h	CS 44h		-	1,22 ^a	-	33,7 ^a
Fierro et al, 2017	2 PGF int. 7 d	CS 48h	-	-	1,39 ± 0,52 ^a	-	28,8 ^a
	2 PGF int. 10 d	CS 56h	-	-	1,48 ± 0,53 ^a	-	30,3 ^a
	2 PGF int. 12 d	CS 56h	-	-	1,40 ± 0,52 ^a	-	46,0 ^b
	2 PGF int. 14 d	CS 56h	-	-	1,59 ± 0,52 ^a	-	56,9 ^b
	2 PGF int, 16 d	CS 56h	-	-	1,51 ± 0,53 ^a	-	56,0 ^b

Abreviações: EST: taxa de estro; IIE: Intervalo de início de estro; OVUL: taxa de ovulação; IIO: Intervalo de início da ovulação; P: taxa de prenhez; PGF: prostaglandina F2 α ; IA: inseminação artificial; CS: cervical superficial. ^{a,b}indicam diferença ($P \leq 0,05$) entre as linhas para cada estudo.

Mesmo que uma aplicação de PGF já demonstre capacidade de sincronia, apenas uma parcela dos animais apresenta CL responsivo quando a PGF é aplicada em fêmeas em fases aleatórias do ciclo. Assim sendo, o protocolo se torna mais eficiente quando se tem conhecimento do momento do ciclo (Fierro et al, 2011). Estudos realizados durante a estação reprodutiva, investigando o efeito da associação de PGF a técnicas adjuvantes na sincronização como “flushing” (Viñoles

et al., 2005), efeito macho (Contreras-Solis et al., 2009; Ungerfeld, 2011), indutores de crescimento folicular (eCG) (Vilariño et al., 2017) e indutores de ovulação (GnRH) (Olivera-Muzante et al., 2013), não demonstraram efeito positivo na fertilidade em comparação a PGF isoladamente.

Indutores de ovulação

A fim de melhorar a sincronização do momento de ovulação das fêmeas, é possível associar nos protocolos de sincronização (com base em P4 ou PGF) a administração de eCG, que estimula o crescimento folicular, através da ligação aos receptores de FSH e LH, aumentando a produção de estradiol pelo folículo, e consequentemente, de P4 após a luteinização (Hashim et al., 2013). Também há relatos da utilização de GnRH e hCG como indutores da ovulação, embora a utilização destes produtos ainda não esteja bem estabelecida em ovinos.

Na maioria dos protocolos, a aplicação do eCG ocorre no momento da retirada do dispositivo, demonstrando melhores concentrações de progesterona após a ovulação, em comparação à aplicação antes de retirada (Hashim et al., 2013). Apesar de efetiva, a administração de eCG apresenta algumas limitações. Por se tratar de uma molécula complexa e ser proveniente da espécie equina, sua administração induz a uma resposta imunológica em ovinos, o que pode afetar negativamente a fertilidade subsequente (Roy et al., 1999). O uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor de ovulação em protocolos de sincronização também tem sido avaliado. Gómez-Brunet et al (2007), avaliaram o efeito da administração de 500UI de hCG no momento da IA realizada via cervical 56 h após remoção do DIV (e administração de eCG), e verificaram melhora na taxa de prenhez somente em rebanhos com histórico de baixa fertilidade. Possivelmente, a melhora na taxa de prenhez seja decorrente de maiores níveis de P4 na fase luteal subsequente ao tratamento.

A combinação das gonadotrofinas eCG e hCG (400UI eCG e 200UI de hCG), produzida originalmente para uso em suínos, tem sido avaliada para indução de estro em ovelhas nulíparas ou em anestro estacional (D'Souza et al., 2014), como uma alternativa ao uso de eCG. Quando comparado a protocolo baseado apenas em progestágeno, observou-se um aumento do sucesso reprodutivo de ovelhas em

anestro, aumentando a resposta nas taxas de estro e prenhez (Knights et al., 2015). Em contrapartida, quando comparado a protocolo com dose ajustada de eCG para animais em anestro, o uso de eCG+hCG resultou em maior dispersão de manifestação de estro (Cline et al., 2001), o que dificulta a utilização em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo.

Protocolos associados ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) são menos comuns, apresentando resultados controversos. Embora o momento da aplicação de GnRH após a retirada da P4 em protocolos de sincronização não esteja bem estabelecido, é sabido que quanto mais tardia for sua aplicação, maior a probabilidade de haver um folículo dominante responsivo ao pico de LH gerado. Olivera-Muzante et al. (2013) comparam a fertilidade de ovelhas sincronizadas através de duas aplicações de PGF com intervalo de 7 dias, com ou sem aplicação de GnRH 24 ou 36 h após a segunda PGF. Todas as ovelhas foram inseminadas 44 h após a segunda PGF, sendo que a administração de GnRH não trouxe nenhum benefício ao protocolo.

Utilizando um protocolo baseado na aplicação de GnRH-PGF-GnRH, Ali et al. (2009) demonstraram que o GnRH 24 h após a PGF2 α reduziu a taxa de manifestação de estro e afetou negativamente as taxas de concepção após monta natural, em comparação a protocolos utilizando P4 + eCG ou duas aplicações de PGF (com intervalo de 11 dias). Já Hashem et al. (2013) avaliaram a dinâmica folicular de ovelhas sincronizadas com o protocolo Ovsynch (GnRH no D0; PGF no D7 e GnRH no D9), originalmente desenvolvido para bovinos, e observaram uma redução na manifestação e duração de estro, porém maior taxa e sincronia de ovulação em comparação à ovelhas sincronizadas com duas aplicações de PGF com 11 dias de intervalo.

Considerações finais

Com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva da produção ovina, o produtor se beneficia com a variedade de protocolos existentes e o poder de escolher aquele que melhor se encaixa ao manejo da sua propriedade. Todos os protocolos vistos são eficientes na indução de estro e ovulação, embora protocolos a base de progesterona ou análogos e eCG apresentem melhor sincronização de

estro e melhores taxas de fertilidade, especialmente após IATF com sêmen fresco ou congelado. Cabe ainda ressaltar que, por mais estabelecido que o protocolo seja, seu sucesso dependerá de fatores como estação reprodutiva, clima, manejo da propriedade, condição corporal e principalmente da resposta individual da fêmea.

Referências

Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Repro Sci*, v.130, p.173-179, 2012.

Ali A, Hayder M, Saifelnaser EOH. Ultrassonografic and endocrine evaluation of three regimes for oestrus and ovulation synchronization for sheep in the subtropics. *Reprod Dom Anim*, v.44, p.873-878, 2009.

Blaschi W, Lunardelli PA, Marinho LSR, Max MC, Santos GMG, Silva-Santos K, Melo-Sterza FA, Baldassare H, Rigo TR, Seneda MM. Effects of progestagen exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. *J Vet Sci*, v.15, p.433-437, 2014.

Cline MA, Ralston JN, Seals RC, Lewis GS. Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or PG600 to estrus and ovulation in ewes. *J Anim Sci*, v.79, p.589-594, 2001.

Contreras-Solís I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, Lopez-Sebastian A, Gonzalez-Bulnes A. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology*, v.71, p.1018-1025, 2009.

Daniel JA, Sterle SW, McFaddin-Buff EL, Keisler DH. Breeding ewes out-of-season using melengestrol acetate, one injection of progesterone, or a controlled internal drug releasing device. *Therio*, v.56, p.105-110, 2001.

D’Souza KN, Rastle-Simpson SL, Redhead AK, Baptiste QS, Smith B, Knights M. Gonadotropin stimulation using PG600® on reproductive success of non-lactating anestrous ewes. *Anim Reprod Sci*, v.148, p.115-120, 2014.

Evans ACO, Flynn JD, Quinn KM, Beard AP. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestogen estrus synchronization protocol in ewes. *Therio*, v.56, p.932-936, 2001.

Evans G, Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 194p.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Estatísticas FAO, 2014. Disponível em: <http://faostat3.fao.org>. Acessado em 07/06/2017.

Fierro S, Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*, v.76, p.630-639, 2011.

Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Anim Reprod Sci*, v.167, p.74-82, 2016.

Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, v.90, p.109-113, 2017.

Gómez-brunet A, Santiago-Moreno J, Monotor V, Garde J, Pons P, González-Bulnes A, López-Sebastian A. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. *Small Rum Res*, v.71, p.117-122, 2007.

Hansel W, Convey EM. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci*, v.57, p.404-424, 1983.

Hashem NM, El-Zarkouny SZ, Taha TA, Abo-Elezz ZR. Oestrus response and characterization of the ovulatory wave following oestrus synchronization using PGF₂ α alone or combined with GnRH in ewes. *Small Rum Res*, v.129, p.84-87, 2013.

Hashim NH, Syafnir, Sembiring M. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. *Biom Res*, v.24, p.7-12, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>. Acesso em 07/06/2017.

Knights M, Ramgattie R, Siew N, Singh-Knights D, Bourne G. Effectiveness of a short-term treatment with progesterone injections on synchrony of lambing and fertility in tropical hair sheep. *Anim Reprod Sci*, v.126, p.70-75, 2011.

Knights M, Redhead A, D'Souza K, Baptiste Q. Effect of stimulation with a gonadotropin mixture on reproductive outcome in nulliparous ewes bred during

seasonal anestrus and early breeding season. *Anim Reprod Sci*, v.159, p.198-204, 2015.

Leyva V, Buckrell BC, Walton JS. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestogen and PMSG in anestrus ewes. *Theriogenology*, v.50, p.377-393, 1998.

Manes J, Hozbor F, Alberio R, Ungerfeld R. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. *Small Rum Res*, v.120, p.108-111, 2014.

Martemucci G, D'Alessandro AG. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF_{2α}, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim Reprod Sci*, v.123, p.32-39, 2011.

Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev*, V.16. p.403-413, 2004.

Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, v.75, p.1232-1238, 2011.

Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C, Fierro S. Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24h or 36h following a prostaglandin F_{2α}-based protocol for timed IA in ewes. *Anim Reprod Sci*, v.138, p.175-179, 2013.

Roy F, Combes B, Valman D, Cribiu EP, Pobel T, Delétang F, Combarous Y, Guillou F, Maurel MC. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol Reprod*, v.61, p.208-218, 1999.

Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F_{2α}. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.47-55, 2003.

Santos-Neto PC, García-Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livest Sci*, v.182, p.125-128, 2015.

Ungerfeld R. Combination of the ram effect with PGF_{2α} estrous synchronization treatment in ewes during the breeding season. *Anim Reprod Sci*, V.124. p.65-68, 2011

Ungerfeld R. Reproductive response of mature and nulliparous yearling ewes to the ram effect during the non- breeding season. *Small Rum Res*, v.140, p.37-39, 2016.

Ungerfeld R, Rubianes E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA, CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Rumin Res*, v.46, p.63-66, 2002.

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

Vilariño M, Cuadro F, Santos-Neto PC, García-Pintos C, Menchaca A. Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology*, v.90, p.164-168, 2017.

Viñoles C, Forsberg M, Banchemo 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.

Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reprod*, v.129, p.299-309, 2005.

2.2 Artigo 2

Viabilidade do uso de associação gonadotrópica para indução de ciclicidade em cordeiras pré-púberes fora da estação reprodutiva

Jennifer Hauschildt Dias, Vladinis Oliveira Miranda†, Fernando Caetano Oliveira, Sérgio Farias Vargas Junior, Cristina Sangoi Haas, Vitória Gasperin Guazzelli Costa, Arnaldo Diniz Vieira, Bernardo Garziera Gasperin, Carine Dahl Corcini.

Será submetido à revista Small Ruminant Research.

2 Viabilidade do uso de associação gonadotrófica para indução de ciclicidade
3 em cordeiras pré-púberes fora da estação reprodutiva

4
5 Viability of the use of the gonadotrophic association for the induction of
6 cyclicity in prepubescent ewe lambs outside the reproductive season

7
8 J.H. Dias^{1,2}, V.O. Miranda†^{1,2}, F.C. Oliveira^{1,2}, S.F. Vargas Junior^{1,2}, C.S.
9 Haas^{1,2}, V.G.G. Costa^{1,2}, Vieira, A.D. ¹, B.G. Gasperin¹, C.D. Corcini^{1*}.

10 ¹ Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária -
11 Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

12 ² Associados ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária –
13 Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

14 *Campus Universitário S/N – CEP: 96010-900 – Capão do Leão, Rio Grande
15 do Sul, Brasil. Correspondência: corcinicd@gmail.com

16
17 **RESUMO:**

18 O uso da associação de gonodotrofina coriônica equina (eCG) e
19 gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma alternativa em países onde a eCG não
20 é disponível isoladamente. Apesar da presença de hCG potencialmente resultar em
21 maior suplementação de LH e, conseqüentemente, em um possível incremento na
22 sincronia de ovulação e função luteal, não há estudos comparando a utilização de
23 eCG+hCG em relação a eCG isoladamente. Portanto, em um primeiro experimento
24 18 fêmeas ovinas na contra-estação reprodutiva foram submetidas aos seguintes
25 protocolos: dispositivo intravaginal impregnado com MAP (DIV) por 12 dias (MAP;
26 n=6), DIV por 12 dias associado à 400UI de eCG na retirada do dispositivo (eCG;
27 n=6) ou DIV por 12 dias associado à 400UI eCG e 200UI hCG (eCG+hCG; n=6) na
28 retirada do dispositivo; para avaliação do desenvolvimento folicular, sendo
29 observado um maior crescimento folicular nos grupos tratados com gonadotrofinas
30 em comparação ao MAP (P<0,05). Os níveis de progesterona nove dias após os
31 tratamentos foram superiores no eCG+hCG em comparação aos demais grupos.
32 Posteriormente, 66 cordeiras pré-púberes foram submetidas aos mesmos
33 tratamentos do experimento 1 e exposição à monta natural com carneiros. A taxa de
34 manifestação de estro foi superior em eCG (88,5%; 23/26) e eCG+hCG (85,2%;
35 23/27), em comparação ao MAP (33,3%; 4/12; P<0,05). A taxa de prenhez foi

36 superior no eCG (34,6%; 9/26) em relação ao MAP (0%; 0/13; $P < 0,05$) e
37 intermediária no grupo eCG+hCG (18,6%; 5/27). Os níveis de progesterona sérica
38 não diferiram entre os grupos eCG e eCG+hCG, sendo observado apenas um efeito
39 do momento. Coletivamente, os resultados sugerem que a associação de eCG+hCG
40 não traz benefícios em relação ao uso de eCG isoladamente.

41

42 **Palavras Chave:** anestro; crescimento follicular; ovelhas; protocolo hormonal;
43 reprodução.

44

45 1. Introdução:

46 O aumento significativo da demanda por produtos de origem ovina no Brasil,
47 resultado da valorização, traz novos desafios na busca por tecnologias que
48 permitam ao produtor obter melhores resultados de produção. Uma vez que a
49 estacionalidade reprodutiva em pequenos ruminantes é um limitante para expansão
50 da produção (Fatet et al., 2011), a utilização de protocolos hormonais durante o
51 período de anestro se torna uma alternativa, não apenas por induzir a ciclicidade dos
52 animais, como também por reduzir o intervalo entre partos, aumentando assim a
53 eficiência produtiva. Durante o período de anestro, protocolos a base de
54 progestágenos associados a gonadotrofina são comumente utilizados, por terem a
55 vantagem de permitir a sensibilização do eixo hipotalâmico-hipofisário, estimulando
56 o crescimento follicular e, conseqüentemente, a manifestação de estro e ovulação
57 fértil em animais acíclicos (Abecia et al., 2012).

58 As gonadotrofinas possuem atividade semelhante aos hormônios FSH e LH,
59 acarretando em incremento da resposta ovariana devido ao estímulo do crescimento
60 follicular, sendo o uso de eCG a forma de suplementação mais estabelecida na
61 espécie ovina (Boscos et al., 2002). Dentre os benefícios da utilização da eCG, é
62 notável o aumento dos índices de fertilidade e prolificidade, além da redução no
63 intervalo de início de estro e concentração do momento de ovulação (Murphy, 2012).
64 Além disso, reporta-se a importância da utilização de eCG como meio de aumentar a
65 previsibilidade da ovulação, melhorando as taxas reprodutivas quando utilizado
66 inseminação artificial (Kridli e Al-Khetib, 2006).

67 Assim como a eCG, a hCG possui grande atividade luteotrópica, com
68 conseqüente aumento da secreção de P4, além de estímulo da maturação oocitária,
69 causando ovulação de folículos menores. Em bovinos (De Rensis et al., 2008) e

70 ovinos (Gomez-Brunet et al., 2007) o uso de hCG parece aumentar as taxas de
71 prenhez em fêmeas com histórico de perda embrionária ou baixa fertilidade. Em
72 cabras em anestro, a utilização de hCG 24h após a remoção do DIV possibilita taxas
73 reprodutivas semelhantes às obtidas após utilização de eCG (Fonseca et al., 2005).
74 O uso da associação de eCG e hCG, comumente utilizada em suínos com falhas
75 reprodutivas (Breen et al., 2006), é uma alternativa em países onde a eCG não é
76 disponível isoladamente. Apesar da presença de hCG potencialmente resultar em
77 maior suplementação de LH e, conseqüentemente, em um possível incremento na
78 sincronia de ovulação e função luteal, não há estudos comparando a utilização de
79 eCG+hCG em relação a eCG isoladamente em ovinos.

80 Com base no acima exposto, formulou-se a hipótese de que a suplementação
81 de hCG em um protocolo com progestágeno e eCG possibilita uma melhora nos
82 parâmetros reprodutivos em ovinos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a
83 eficiência reprodutiva do uso de associação de 400UI de eCG e 200UI de hCG para
84 indução de estro e ovulação em cordeiras pré-púberes e em ovelhas durante o
85 anestro sazonal.

86

87 **2. Material e Métodos:**

88 Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em
89 Experimentação Animal-CEEA Processo nº 7340-2016.

90

91 *2.1. Experimento 1: Dinâmica Folicular*

92 *2.1.1. Animais e Protocolo de Sincronização de Estro:*

93 No mês de novembro, durante a contra-estação reprodutiva, 18 fêmeas
94 ovinas da raça Ideal, com até 24 meses de idade e ECC médio 3 (escala de 1 a 5),
95 foram submetidas a protocolo de indução de ovulação e avaliação da dinâmica
96 folicular. As fêmeas eram mantidas a pasto nativo com fornecimento de água *ad*
97 *libitum*. Todos os animais estavam em anestro estacional, confirmados por laudo
98 sorológico, com dosagens de progesterona abaixo de 1 ng/mL Todos os animais
99 foram submetidos a protocolo de indução de ovulação, com esponjas impregnadas
100 com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), inseridas via intravaginal, e
101 mantidas por doze dias. No dia da retirada das esponjas (D0), os animais foram
102 aleatoriamente divididos em três grupos e submetidos a um dos tratamentos:
103 dispositivo intravaginal impregnado com MAP (DIV) (MAP; n=6), DIV associado à

104 400UI de eCG (Novormon[®], Zoetis, Campinas, SP, Brasil) na retirada do dispositivo
105 (eCG; n=6) ou DIV associado à 400UI eCG e 200UI hCG (Chorulon[®], MSD Saúde
106 Animal, São Paulo, SP, Brasil) (eCG+hCG; n=6) na retirada do dispositivo.

107 *2.1.2. Avaliação Ultrassonográfica:*

108 O exame ultrassonográfico foi realizado em todas as fêmeas, utilizando
109 ultrassom modo-B (Mindray DP-2200 VET[®], Shenzhen, China) equipado com
110 transdutor linear de 7,5 MHz adaptado com prolongador de alumínio, pela via
111 transretal. Os exames iniciaram 24 h após a aplicação dos tratamentos, sendo
112 realizados a cada 12 h, durante quatro dias. Foi feita a medição e localização
113 relativa dos folículos e avaliação dos padrões de crescimento e regressão folicular
114 (mm/dia). Considerou-se ovulação quando folículos que haviam atingido diâmetro
115 pré-ovulatório desapareceram ao exame ultrassonográfico.

116 *2.1.3. Coleta de Sangue:*

117 Foram feitas coletas de sangue por venopunção da jugular com auxílio de
118 Vacutainer[®] (BD Vacutainer[®], São Paulo, SP, Brasil) no dia da inserção das
119 esponjas com MAP (D-12) e nove dias após a retirada dos DIVs (D9), para dosagem
120 de progesterona. Uma coleta foi realizada dois dias após a retirada dos DIV para
121 dosagem de estradiol. As amostras foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos
122 e o soro analisado em laboratório particular pela técnica de quimioluminescência,
123 com valores intra e inter-ensaio inferior a 10%.

124

125 *2.2. Experimento 2: manifestação de estro e taxas de prenhez*

126 *2.2.1. Animais e protocolo de sincronização de estro*

127 Nos meses de setembro e outubro, durante a contra-estação reprodutiva, 66
128 fêmeas ovinas da raça Ideal com até doze meses de idade e peso médio 28,7kg
129 ($\pm 3,29$), foram submetidas a protocolo de indução de ovulação e acasalamento por
130 monta natural. As fêmeas eram mantidas a pasto nativo com fornecimento de água
131 *ad libitum*. As mesmas estavam em anestro estacional, confirmado por laudo
132 sorológico, com dosagens de progesterona abaixo de 1 ng/mL (dados não
133 demonstrados). Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de
134 indução de ovulação do experimento 1, sendo divididos em três grupos: grupo MAP
135 (n=13), grupo eCG (n=26) e grupo eCG+hCG (n=27). Imediatamente após remoção
136 do DIV e aplicação dos tratamentos, as cordeiras foram expostas a acasalamento
137 por monta natural com machos aptos à reprodução, avaliados previamente por

138 exame andrológico, na proporção de 1:15. O diagnóstico de gestação foi realizado
139 aproximadamente 25 dias após o momento esperado da ovulação (D28), através de
140 exame ultrassonográfico com ultrassom modo-B (Sonoscape A5 Vet) equipado com
141 transdutor linear de 7,5MHz adaptado com prolongador, pela via transretal.

142 *2.2.2. Monitoramento da manifestação de estro:*

143 Os machos foram equipados com coleite marcador para que fosse possível a
144 visualização do acasalamento. A partir da inserção dos machos no rebanho (Hora 0)
145 foi monitorado a manifestação estral das fêmeas a cada 4 horas, durante 120 horas,
146 onde foi considerada em estro a fêmea que tivesse a garupa marcada com tinta. A
147 cada 8 horas, as fêmeas marcadas eram separadas das demais.

148 *2.2.3. Coletas de sangue:*

149 Foram feitas coletas de sangue por venopunção da jugular com auxílio de
150 Vacutainer® (BD Vacutainer®, São Paulo, SP, Brasil) no dia da inserção das
151 esponjas com MAP (D-12), para verificação do anestro sazonal e novamente nos
152 dias D9 e D14 posterior à retirada das esponjas, para dosagem de progesterona
153 sérica. As amostras foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos e o soro
154 analisado em laboratório particular pela técnica de quimioluminescência, com
155 valores intra e inter-ensaio inferior a 10%.

156

157 *2.3. Análise Estatística:*

158 Os resultados das taxas de manifestação estral e prenhez obtidos do
159 experimento 1 foram analisados pelo teste exato de Fischer. Os dados da dosagem
160 de progesterona não apresentaram distribuição normal e foram transformados para
161 logaritmo e analisados por análise de variância com medidas repetidas, avaliando a
162 interação tratamento e coleta, com comparação entre médias utilizando o Teste de
163 Tukey. No experimento 2, os dados de dinâmica folicular, dosagem de progesterona
164 e estradiol foram normalizados e analisados por análise de variância simples
165 (ANOVA) com efeito do tratamento por grupo e comparação entre médias. Todas as
166 análises foram conduzidas utilizando Statistix®.

167

168

169

170

171

172

3. Resultados:

173

3.1. Experimento 1: Dinâmica Folicular:

174

175

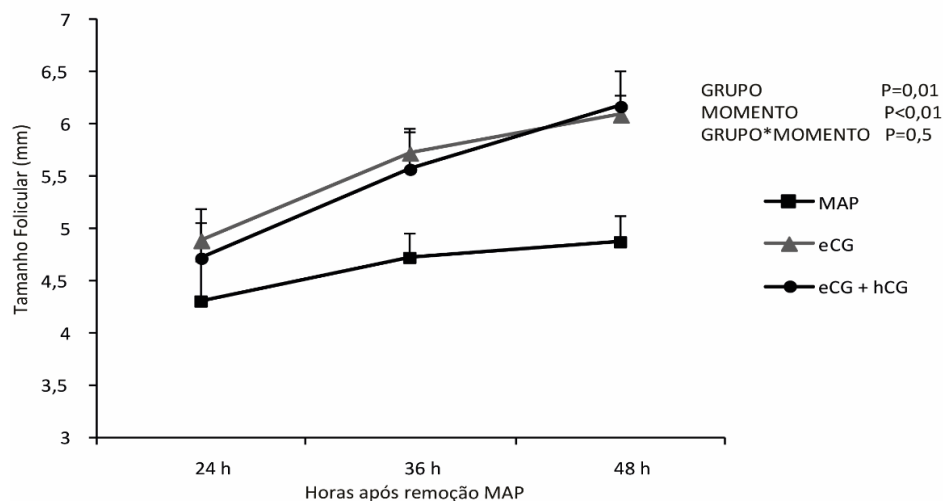
176

177

178

179

Os grupos eCG e eCG+hCG apresentaram maior crescimento folicular em relação ao MAP (Figura 1). Ambos os grupos tratamento apresentaram folículos com média acima de 6mm no terceiro momento de observação (48h), enquanto que o grupo MAP apresentou folículos de 4,8mm de média. O momento de avaliação também diferiu ($p<0,01$), demonstrando que houve um padrão de crescimento folicular. A interação grupo e momento não foi significativa ($P=0,5$).



180

181

182

183

184

185

Figura 1: Taxa de crescimento folicular em ovelhas submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro estacional.

^{a,b} Diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$).

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

A taxa de ovulação está demonstrada na Tabela 1. Apenas dois animais do grupo MAP ovularam (2/6) e as ovulações ocorreram após 84h (6º momento de avaliação). Todos os animais do grupo eCG ovularam (6/6), sendo o pico às 60h (4º momento de avaliação), porém dois animais ovularam às 72h (5º momento de avaliação). Observou-se dupla ovulação em três animais deste grupo, sendo um total de 9 folículos ovulados. Já no grupo eCG+hCG, foi observada uma dispersão do momento de ovulação. O pico de ovulação se deu às 72h (5º momento de avaliação), porém dois animais ovularam às 60h e um às 84h. Também foi observado ovulação múltipla em dois animais, sendo um total de 8 folículos ovulados. Este grupo também apresentou ovulação de folículos de 9,2mm e 13mm.

196

197 Tabela 1: Taxa de ovulação e diâmetro máximo pré-ovulatório de ovelhas
 198 submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6);
 199 eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias
 200 MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro
 201 estacional.

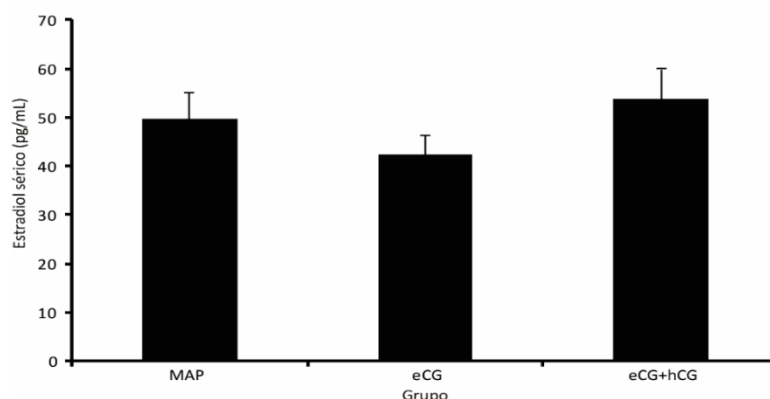
Grupo	Folículos ^a				Ovelhas Ovuladas ^b	Diâmetro máximo pré-ovulatório
	60h	72h	84h	96h		
MAP			1	1	2/6 (33,3%)	5,3 mm
eCG	7	2			6/6 (100%)	6,7 mm
eCG+hCG	2	4	2		5/6 (83,3%)	13 mm

202 ^a Número de folículos ovulados no momento de observação

203 ^b Número de ovelhas que ovularam sobre o total de ovelhas submetidas ao
 204 protocolo, ao final da observação

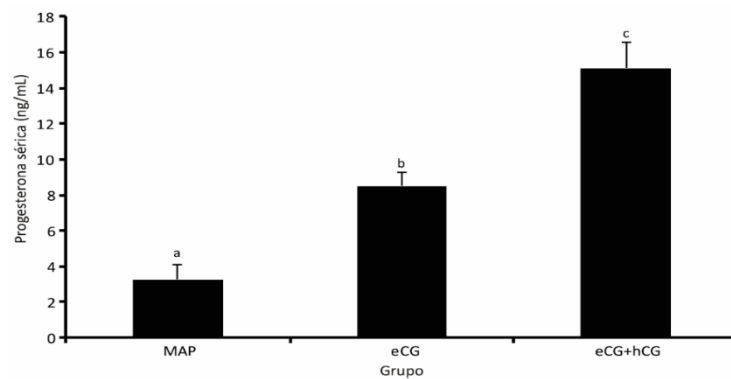
205

206 Não houve diferença estatística ($P=0,53$) nos níveis de estradiol entre os
 207 grupos no D2, o que sugere que os animais responderam ao protocolo e
 208 demonstraram estro (Figura 2). Todos os grupos diferiram entre si nos níveis séricos
 209 de progesterona no D9, sendo que o eCG+hCG apresentou maiores concentrações
 210 em comparação aos grupos MAP e eCG (Figura 3).



211 Figura 2: Concentração sérica de estradiol (pg/mL) no D2 em ovelhas submetidas a
 212 três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6); eCG – 12 dias
 213 MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG
 214 + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro estacional.

215

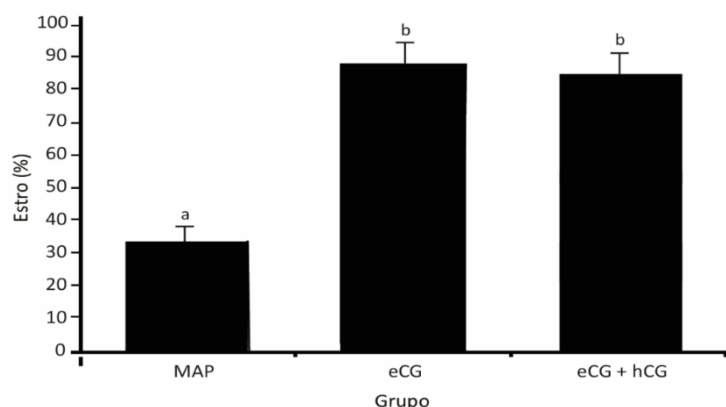


216 Figura 3: Concentração sérica de progesterona (ng/mL) no D9 em ovelhas
 217 submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=6);
 218 eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=6); eCG+hCG – 12 dias
 219 MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=6), durante o anestro
 220 estacional. ^{a,b} Diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos (P <
 221 0,05).

222

223 3.2. Experimento 2: Manifestação de estro e taxa de prenhez

224 Um total de 50 animais (76,9%) manifestaram estro, sendo 33,3% (4/12),
 225 88,5% (23/26) e 85,2% (23/27) nos grupos MAP, eCG e eCG+hCG,
 226 respectivamente. Houve diferença estatística (P<0,05) entre os tratamentos eCG e
 227 eCG+hCG em relação ao MAP. Os dados da taxa de manifestação estral estão
 228 representados na Figura 4

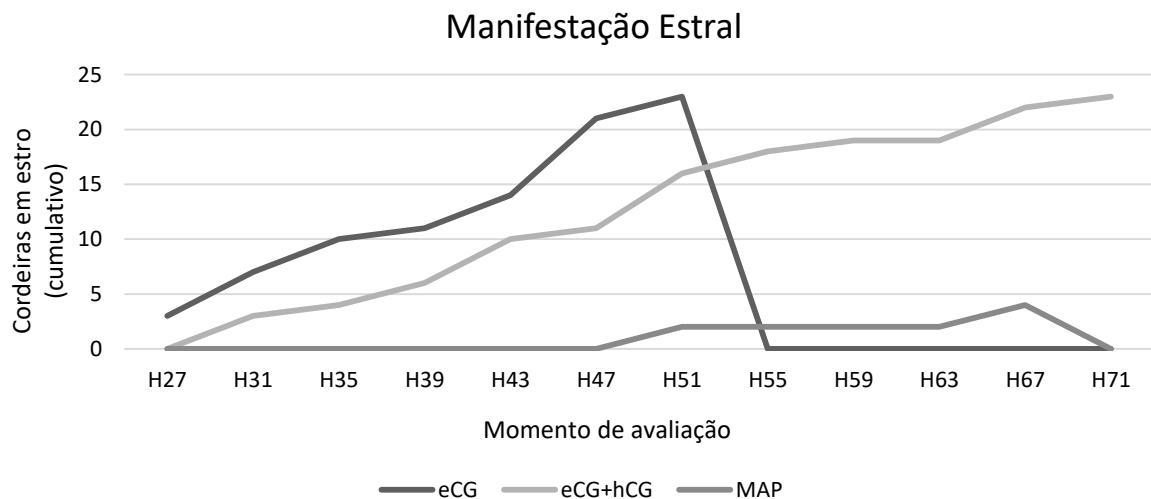


229 Figura 4: Taxa de manifestação de estro de cordeiras pré-púberes submetidas
 230 a três protocolos de indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias
 231 MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI
 232 eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27), durante o anestro estacional.

233 ^{a,b} Diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

234

235 Foi observada uma manifestação de estro mais dispersa no grupo eCG+hCG,
 236 onde os animais apresentaram as marcações na garupa entre os momentos H31 à
 237 H71 de observação (Figura 5). Todos os animais que manifestaram estro do grupo
 238 eCG foram marcados até o momento H51. Os animais do grupo MAP demonstraram
 239 estro apenas após 51 horas. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre todos os
 240 grupos no momento H51, onde foi observado que o grupo eCG apresentou a maior
 241 quantidade acumulada de fêmeas em cio (88,46%) em comparação aos grupos MAP
 242 (16,6%) e eCG+hCG (55,5%).



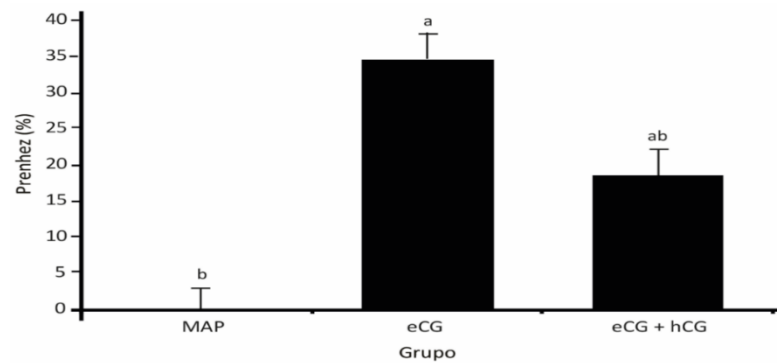
243

244 Figura 5: Manifestação estral cumulativa observada em um período de 120h de
 245 cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP –
 246 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26);
 247 eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27),
 248 durante o anestro estacional.

249

250 As taxas de prenhez (Figura 6) foram de 0% (0/13), 34,6% (9/26) e 18,5%
 251 (5/27), respectivamente, para os grupos MAP, eCG e eCG+hCG. Houve diferença
 252 estatística entre o grupo tratado com eCG e MAP ($P = 0,03$). A taxa de prenhez no
 253 grupo eCG+hCG não diferiu em relação aos demais grupos.

254



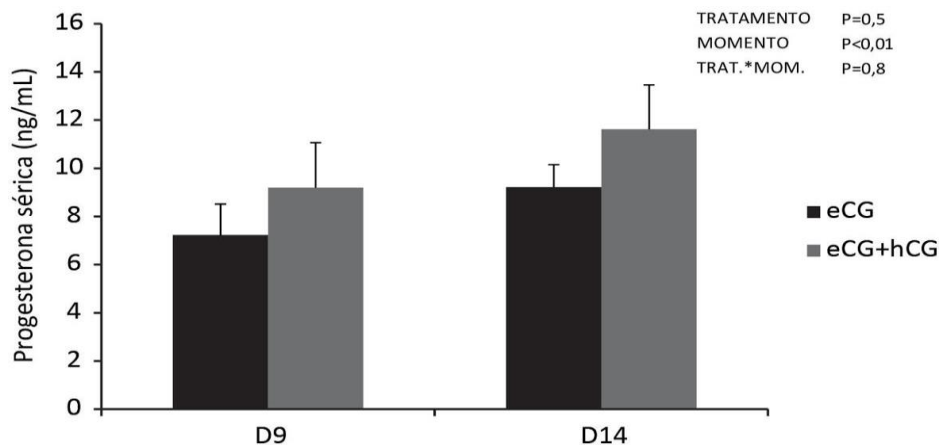
255

256 Figura 6: Taxa de prenhez de cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de
 257 indução à ovulação: MAP – 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG
 258 na retirada do DIV (n=26); eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na
 259 retirada do DIV (n=27), durante o anestro estacional.

260 ^{a,b} Diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

261

262 Houve um incremento nos níveis de progesterona sérica entre os momentos
 263 D9 e D14. Entretanto, não se observou efeito dos tratamentos nem uma interação
 264 momento *versus* tratamento (Figura 7).



265

266 Figura 7: Nível de progesterona sérica (ng/mL) nos dias D9 e D14 observada em
 267 cordeiras pré-púberes submetidas a três protocolos de indução à ovulação: MAP –
 268 12 dias MAP (n=13); eCG – 12 dias MAP + 400UI eCG na retirada do DIV (n=26);
 269 eCG+hCG – 12 dias MAP + 400UI eCG + 200UI hCG na retirada do DIV (n=27),
 270 durante o anestro estacional.

271

272

273 4. Discussão:

274 No presente estudo, comparou-se a utilização da combinação eCG+hCG em
275 relação ao uso de eCG isolado ao final do tratamento com progestágeno em
276 cordeiras pré-púberes durante o anestro estacional. Os principais achados foram: I -
277 o uso de eCG ou eCG+hCG é capaz de induzir estro e ovulação em cordeiras pré-
278 púberes, embora taxas superiores de prenhez sejam observadas após tratamento
279 com eCG isoladamente; II - ovelhas em anestro tratadas com eCG+hCG apresentam
280 taxas de crescimento folicular semelhantes às tratadas com eCG e, apesar da
281 menor sincronia de ovulação, a suplementação de eCG+hCG repercute em níveis
282 superiores de progesterona no dia 9 após o tratamento. A suplementação de
283 gonadotrofinas é essencial para promover o crescimento folicular e estimular a
284 ciclicidade em fêmeas ovinas pré-púberes ou fora da estação reprodutiva. Esta
285 suplementação é comumente realizada através da administração de eCG, uma
286 molécula capaz de se ligar aos receptores de FSH e LH (Murphy, 2012).
287 Alternativamente, especialmente em países onde a eCG não é disponível
288 isoladamente, a única alternativa é a administração de eCG combinada ao hCG.
289 Embora as duas abordagens sejam eficientes, não há informação sobre qual
290 tratamento possibilita uma melhor resposta em fêmeas acíclicas.

291 Em um primeiro experimento objetivou-se caracterizar o crescimento folicular
292 com o uso dos tratamentos de indução a ovulação em ovelhas acíclicas. Podemos
293 observar que o protocolo eCG+hCG foi capaz de promover crescimento folicular, o
294 que já era esperado. Porém, evidenciou-se uma dispersão do momento de ovulação
295 neste grupo, visto que enquanto a maioria dos folículos ovulatórios do grupo eCG já
296 haviam ovulado, a ovulação seguia acontecendo no grupo eCG+hCG. Na literatura
297 não há relatos sobre a avaliação do desenvolvimento folicular em protocolo de
298 associação de eCG+hCG. Usando protocolo P4-eCG, Barret et al (2004) não
299 encontraram diferença entre a porcentagem de folículos ovulados durante o período
300 de estro ou anestro, com diâmetro máximo de folículo pré-ovulatório de $6,1 \pm 0,1$
301 mm, concordando com nossos resultados para o mesmo tratamento. A ovulação de
302 folículos maiores que 7mm, observada no grupo P4-eCG+hCG deste trabalho, indica
303 uma maior ação de LH sobre o folículo, promovendo o crescimento folicular, o que
304 pode estar atrelado ao efeito luteinizante de ambas as gonadotrofinas ou a um maior
305 período de ação das mesmas.

306 Curiosamente, o tratamento com eCG+hCG induziu a um incremento
307 significativo nos níveis de P4 em ovelhas nove dias após o tratamento em
308 comparação aos demais grupos. Como esperado, o grupo MAP apresentou as
309 menores concentrações de P4. Ambos eCG e hCG são capazes de elevar os níveis
310 de progesterona devido a seus efeitos luteotrópicos (Souza et al., 2009; Gómez-
311 Brunet et al., 2007). Acreditamos que o maior período de ovulação do grupo tratado
312 com a associação tenha causado este aumento, já que folículos continuaram
313 crescendo e ovulando enquanto que no grupo eCG o intervalo de ovulação já havia
314 cessado. É relatado ainda que o hCG possui capacidade de promover aumento na
315 circulação sanguínea no CL, que pode estar relacionado ao aumento da
316 progesterona circulante (Zygmunt et al., 2002). Os maiores níveis de progesterona
317 observados em ovelhas tratadas com eCG+hCG pode influenciar positivamente a
318 manutenção da gestação em receptoras de embriões, embora esta hipótese
319 necessite ser testada.

320 No experimento 2, cordeiras de ambos os grupos tratados com
321 gonadotrofinas manifestaram estro em taxas acima de 80%, sem apresentar
322 diferença estatística. Já as fêmeas tratadas apenas com progestágeno (MAP)
323 apresentaram baixa manifestação de estro (33,3%). Esses resultados corroboram
324 com os obtidos por D'Souza et al. (2014), em ovelhas, e Knights et al. (2015), em
325 cordeiras, que encontraram manifestação estral significativamente inferior em
326 animais tratados apenas com P4 (79,2% e 52,6%, respectivamente) em comparação
327 com as fêmeas tratadas com P4+eCG+hCG (94,2% e 77,9%, respectivamente).
328 Entretanto, Knights et al. (2015) demonstraram que a exposição à P4 isoladamente
329 é capaz de induzir a ciclicidade em cordeiras, o que não foi observado no presente
330 estudo. Uma vez que os dois estudos foram realizados nos Estados Unidos, a
331 administração de eCG isoladamente não foi testada.

332 Embora as taxas de manifestação de estro não tenham diferido entre os
333 grupos tratados com gonadotrofinas no presente estudo, foi observada uma maior
334 dispersão no grupo eCG+hCG, o que também foi observado por Cline et al. (2001)
335 utilizando o mesmo protocolo em ovelhas. Cabe ressaltar que no referido estudo
336 foram utilizados implantes com norgestomet, ao invés de MAP ou P4, sendo apenas
337 avaliada a taxa e sincronia de manifestação de estro e ovulação, não sendo
338 investigada a fertilidade dos animais.

339 Assim como neste estudo, Santos et al. (2010) encontraram um início de estro
340 mais tardio no grupo eCG+hCG, em relação aos grupos MAP e eCG. Entretanto, os
341 mesmos autores observaram uma elevada taxa (73,3%) de estro nas ovelhas
342 tratadas apenas com MAP, diferindo do observado no presente estudo. Uma vez
343 que não foi realizada dosagem de P4 nas fêmeas, é possível que uma proporção
344 significativa das ovelhas se encontrava cíclicas, antes dos tratamentos. Contrariando
345 os dados obtidos em ovinos, em cabras a associação eCG+hCG permitiu redução
346 no início do intervalo de estro e maior taxa de prenhez frente ao uso isolado de eCG
347 (Rowe e East, 1995). Para Rowe e East (1995), o efeito sinérgico entre as
348 gonadotrofinas seria capaz de reduzir o intervalo de estro com efeito positivo nas
349 taxas de fertilidade, contrariando outros estudos que acreditavam que o uso de hCG
350 causaria maturação nuclear oocitária ou ovulação prematura.

351 Ambos eCG e hCG são hormônios proteicos, com subunidades α e β , com
352 atividade semelhante às dos hormônios FSH e LH, e alto peso molecular, devido à
353 alta taxa de glicolisação da molécula, que resulta em uma extensa meia-vida
354 plasmática (eCG: 21h em ovinos; hCG: 39,4h em cabras) (Murphy, 2012; Saleh et
355 al., 2012). Enquanto a eCG age promovendo o crescimento folicular, a hCG permite
356 a luteinização de folículos de qualquer tamanho que expressem receptores de LH,
357 possivelmente causando a ovulação de folículos imaturos (Bartlet et al., 2009). Com
358 base nos resultados observados neste e em estudos anteriores, é possível formular
359 a hipótese de que a longa meia-vida do hCG possibilita a ovulação de folículos por
360 um período mais prolongado, inclusive de folículos que não seriam responsivos no
361 momento da aplicação do eCG isoladamente. Entretanto, esta hipótese ainda
362 necessita ser investigada.

363 A administração de indutores de ovulação normalmente é realizada entre 48h
364 prévio ou no momento da retirada do progestágeno. Gomez-Brunet et al. (2007)
365 utilizaram 500UI hCG no momento da IA em um protocolo P4+eCG e só observaram
366 diferença significativa para os parâmetros reprodutivos nas propriedades em que as
367 fêmeas tinham baixa fertilidade. A injeção de hCG 36h após a retirada do DIV e
368 aplicação do eCG não resultou em diferença nas taxas de ovulação e prenhez (Khan
369 et al., 2003) e na concentração de progesterona entre o grupo tratado e o controle
370 (Catalano et al., 2012), bem como o observado neste estudo utilizando a injeção
371 simultânea dos dois hormônios em cordeiras.

372 O uso da combinação gonadotrópica eCG+hCG foi capaz de melhorar a taxa
373 de estro das fêmeas frente ao grupo controle. Porém, a taxa de prenhez entre estes
374 grupos não diferiu, provavelmente devido ao número reduzido de animais que foi
375 utilizado, que não foi suficiente para resultar em diferença estatística. A taxa de
376 prenhez foi maior no grupo eCG em comparação ao MAP, embora sem diferença
377 estatística em relação ao eCG+hCG. Santos et al. (2010) observaram taxa de
378 prenhez superior em ovelhas inseminadas artificialmente após tratamento com eCG
379 em comparação ao eCG+hCG. É possível que a falta de precisão na determinação
380 do momento da ovulação ou falhas ovulatórias no grupo eCG+hCG estejam
381 envolvidos no decréscimo observado na fertilidade, já que há uma grande diferença
382 entre a porcentagem de animais que manifestaram estro (85,2%) e a taxa de
383 prenhez (18,5%).

384 Outra possibilidade seria a ocorrência de uma regressão precoce do corpo
385 lúteo, fenômeno que ocorre em tratamentos com eCG, hCG e GnRH, ligado à baixa
386 secreção de estradiol e progesterona (Rubianes et al., 1996), e que resulta em
387 falhas ovulatórias. Porém, no presente estudo as concentrações de progesterona se
388 mantiveram altas no dia 14, demonstrando que não houve disfunção lútea nas
389 cordeiras que manifestaram estro. Cabe ressaltar que a idade, e o estado nutricional
390 das cordeiras que foram submetidas ao tratamento também podem ter influenciado
391 no resultado. O pico de LH pré-ovulatório no início do estro em cordeiras é
392 significativamente menor que em ovelhas devido a uma estimulação inadequada de
393 gonadotrofinas (Davies e Beck, 1993). Khan et al. (1998) sugerem que ovários de
394 cordeiras são menos responsivos ao GnRH e hCG em comparação a ovelhas
395 multíparas.

396 Os resultados de indução de puberdade do presente estudo poderiam ser
397 superiores, caso fêmeas com maior peso corporal tivessem sido utilizadas, uma vez
398 que, embora a idade à puberdade seja um fator genético, a nutrição é considerada
399 fator principal para o estabelecimento da mesma (Robinson et al., 2006). Entretanto,
400 o peso corporal dos animais utilizados no presente estudo pode ser considerado
401 satisfatório e superior ao alcançado na maioria das propriedades de criação
402 extensiva.

403

404

405

5. Conclusões:

Com base nos resultados obtidos neste estudo, apesar de induzir uma adequada manifestação de estro, a associação de eCG+hCG não traz benefícios para a fertilidade de cordeiras pré-púberes, em relação ao uso de eCG isoladamente. Em cordeiras e ovelhas, apesar do efeito indutor do crescimento folicular e da manifestação de estro, a menor sincronia da ovulação pode limitar a utilização de eCG+hCG em protocolos de IATF.

6. Agradecimentos:

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo amparo financeiro para realização do estudo.

7. Referências:

Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 173-179.

Barret, D.M.W., Bartlewski, P.M., Batista-Arteaga, M., Symington, A., Rawalings, N.C. 2004. 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. *Therio.* 61, 311-327.

Bartlett, A., Pain, S.J., Hughes, P.E., Stott, P., van Wettere, W.H. 2009. The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 219-22

Breen, S.M., Rodrigues-Zas, S.L., Knox, R.V. Effect of altering dose of PG600 on reproductive responses in prepubertal gilts and weaned sows. 2006. *Anim. Reprod. Sci.* 95, 316-323.

Boscos, C.M., Samartzi, F.C., Dellis, S., Rogge, A., Stefanakis, A., Krambovitis, E. 2002. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Therio.* 58, 1261-1272.

- 438 Catalano, R., Teruel, M., Gonzalez, C., Williams, S., Dorna, I.V., Callejas, S.
439 2012. The effect of hCG treatment on follicular characteristics and luteal function in
440 seasonally anestrous ewes lambs. *J. Anim. Vet. Adv.* 12, 2091-2096.
- 441 Cline, M.A., Ralston, J.N., Seals, R.C., Lewis, G.S. Intervals from norgestomet
442 withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or PG600 to estrus and
443 ovulation in ewes. 2001. *J. Anim. Sci.* 79, 589-594.
- 444 Davies, M.C.G., Beck, N.F.G. A comparison of plasma prolactin, LH and
445 progesterone concentration during oestrus and early pregnancy in ewe lambs and
446 ewes. 1993. *Anim. Prod.* 57, 281–286.
- 447 De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., Lopez-Gatius, F.
448 Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm
449 season. 2008. *Therio.* 69, 1077-1082.
- 450 D'Souza, K.N., Rastle-Simpson, S.L., Redhead, A.K., Baptiste, Q.S., Smith,
451 B., Knights, M. Gonadotropin stimulation using PG600® on reproductive success of
452 non-lactating anestrous ewes. 2014. *Anim. Reprod. Sci.* 148, 115-120.
- 453 Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.T., Lebouef, B. Reproductive cycle of goats. 2011.
454 *Anim. Reprod. Sci.* 124, 211-219.
- 455 Fonseca, J.F., Bruschi, J.H., Zambrini, F.N., Demczuk, E., Viana, J.H.M.,
456 Palhão, M.P. Induction of synchronization estrus in dairy goats with different
457 gonadotrophins. 2005. *Anim. Reprod.* 2, 50-53.
- 458 Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Monotor, V., Garde, J., Pons, P.,
459 González-Bulnes, A., López-Sebastian, A. 2007. Reproductive performance and
460 progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the
461 time of AI. 2007. *Small Rum.* 71, 117-122.
- 462 Khan, T.H., Beck, N.F.G., Khalid, D, M. Comparison of luteal function between
463 ewe lambs and ewes during breeding and non-breeding season. 1998. *Anim. Sci.* 98,
464 184-184.
- 465 Khan, T.H., Hastie, P.M., Beck, N.F.G., Khalid, M. hCG treatment on day of
466 mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. 2003. *Anim. Reprod. Sci.*
467 76, 81-89.
- 468 Knights, M., Redhead, A., D'Souza, K., Baptiste, Q. Effect of stimulation with a
469 gonadotropin mixture on reproductive outcome in nulliparous ewes bred during
470 seasonal anestrus and early breeding season. 2015. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 198-
471 204.

- 472 Kridli, R.T., Al-Khetib, S.S. 2006. Reproductive response in ewes treated with
473 eCG or increasing doses of royal jelly. *Anim. Reprod. Sci.* 92, 75–85.
- 474 Murphy, B.D. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential
475 tool. *Anim. Reprod.* 9, 223-230.
- 476 Robinson, J.J., Ashworth, C.J., Rooke, J.Á., Mitchell, L.M., McEvoy, T.G.
477 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126,259-
478 276.
- 479 Rowe, J.D., East, N.E. 1996. Comparison of two sources of gonadotropin for
480 estrus synchronization in does. *Therio.* 45, 1569-1575.
- 481 Rubianes, E., Ungerfeld, R., Ibarra, D. 1996. Serum anti-eCG improves luteal
482 function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. *Small*
483 *Rum.* 21, 105-111.
- 484 Saleh, M., Shahin, M., Wuttke, W., Gauly, M., Holtz, W. 2012.
485 Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats
486 (*Capra hircus*). *Reprod.* 144, 77-81.
- 487 Santos, I. W., Binsfeld, L. C., Weiss, R. R., Kozicki, L. E. 2010. Fertility rates
488 of ewes treated with medroxyprogesterone and Injected with equine chorionic
489 gonadotropin plus human chorionic gonadotropin in anoestrous season. *Vet. Med.*
490 *Int.* 2010.
- 491 Souza, A.H., Viechnieski, S., Lima, F.A., Silva, F.F., Araújo, R., Bo, G.A.,
492 Wiltbank, M.C., Baruselli, P.S. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and
493 type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy
494 cows. *Therio.* 72, 10-21.
- 495 Zygmunt, M., Herr, F., Keller-Schoenwetter, S., Kunzi-Rapp, K., Münstedt, K.,
496 Rao, C.V., Lang, U., Preissner, K.T. 2002. Characterization of Human Chorionic
497 Gonadotropin as a Novel Angiogenic Factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5290-
498 5296.

3 Considerações Finais

Na espécie ovina, desde suas primeiras utilizações, os protocolos de sincronização de estro e ovulação têm sido avaliados quanto aos seus efeitos sob a fisiologia reprodutiva. Estes protocolos evoluíram, não só devido aos hormônios utilizados, como também quanto à forma e ao período de administração, agregando vantagens ao produtor como: praticidade de uso, redução de manejos, possibilidade de utilização de IATF e assim, inserção de valor genético ao rebanho.

Embora diversas alternativas de protocolos hormonais tenham surgido, os índices reprodutivos, principalmente referentes às taxas de prenhez, pouco mudaram, continuando então instáveis e com resultados pouco satisfatórios, principalmente quando utilizada a inseminação artificial em comparação à monta natural. Outra grande desvantagem desta biotecnologia é o alto custo, devido ao valor dos hormônios e da mão de obra utilizada, que muitas vezes se torna fator limitante para seu uso, sobretudo em propriedades menos tecnificadas.

Apesar disso, é válido lembrar que a utilização destes protocolos, além das vantagens já citadas, permite o retorno à ciclicidade em períodos de anestro e o adiantamento da puberdade em cordeiras pré-púberes, aumentando as possibilidades de incrementar a produtividade ovina. Diversos relatos de uso de protocolo P4-eCG na contra-estação reprodutiva resultam em sucesso em indução da ciclicidade, com avaliação da manifestação estral e do crescimento folicular.

Neste estudo, foi possível certificar a eficiência de um protocolo progestágeno associado à gonadotrofina para indução à ciclicidade em cordeiras. O protocolo estudado, P4-eCG+hCG foi capaz de estimular a manifestação de estro e ovulação nestes animais, porém de forma mais dispersa que o protocolo P4-eCG, já estabelecido e amplamente difundido na espécie. Pensando na utilização de manejo de inseminação artificial, a associação destas gonadotrofinas não seria benéfica, apresentando taxas de prenhez menores devido à falta de precisão do momento de ovulação.

A utilização de hCG em protocolos de sincronização de estro ainda não é muito estudada. É possível que sua administração aumente os níveis de progesterona circulante, como observado neste estudo, afetando positivamente a viabilidade embrionária. Contudo, devido à dispersão de estro e ovulação, a de hCG ao protocolo de indução à ovulação não demonstrou resultados benéficos. Mais estudos relacionados ao momento de administração do hCG devem ser feitos, pensando em incremento da viabilidade embrionária.

Conforme os estudos feitos neste trabalho, podemos concluir então que a associação das gonadotrofinas eCG+hCG em um protocolo com progestágeno, apesar de induzir ao estro e a ovulação como esperado, não possui resultados satisfatórios como os obtidos com o uso de P4-eCG isoladamente. A dispersão de ovulação encontrada neste protocolo pode causar redução nas taxas de prenhez e inviabiliza o uso de IATF no manejo reprodutivo das fêmeas. Desta forma, o protocolo P4-eCG, já estabelecido nesta espécie, prevalece como opção, não só pelos melhores índices reprodutivos, como também por induzir à ovulação fértil mesmo em animais em cordeiras pré-púberes durante o anestro estacional.

Referências

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

ALI, A.; HAYDER, M.; SAIFELNASER, E.O.H. Ultrasonografic and endocrine evaluation of three regimes for oestrus and ovulation synchronization for sheep in the subtropics. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, n. 6, p. 873-878, 2009.

BARRET, D.M.W.; BARTLEWISKI, P.M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWALINGS, 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, n. 2-3, p. 311-327, 2004.

BARTLETT, A.; PAIN, S.J.; HUGHES, P.E.; STOTT, P.; VAN WETTERE, W.H. The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1-3, p. 219-22, 2009.

BARTLEWISKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.259-268, fev. 2011.

BLASCHI, W.; LUNARDELLI, P.A.; MARINHO, L.S.R.; MAX, M.C.; SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.; MELO-STERZA, F.A.; BALDASSARE, H.; RIGO, T.R.; SENEDA, M.M. Effects of progestagen exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 3, p. 433-437, 2014.

BREEN, S.M.; RODRIGUES-ZAS, S.L.; KNOX, R.V. Effect of altering dose of PG600 on reproductive responses in prepubertal gilts and weaned sows. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 3-4, p. 316-323, 2006.

BOSCOS, C.M.; SAMARTZI, F.C.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1261-1272, 2002.

CATALANO, R.; TERUEL, M.; GONZALEZ, C.; WILLIAMS, S.; DORNA, I.V.; CALLEJAS, S. The effect of hCG treatment on follicular characteristics and luteal function in seasonally anestrous ewes lambs. **Journal of Animal Veterinary Advances**, v. 12, n. 12, p. 2091-2096, 2012.

CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MIGAUD, M.; THIERY, J. C.; PELLICCERRUBIO, M. T.; MALPAUX, B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. **Reproduction in domestic animals**, v. 43, n. 2, p. 40-7, 2008.

CLINE, M.A.; RALSTON, J.N.; SEALS, R.C.; LEWIS, G.S. Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or PG600 to estrus and ovulation in ewes. **Journal of Animal Science**, v. 79, n.3, p. 589-594, 2001.

CONTRERAS-SOLÍS, I.; VASQUEZ, B.; DIAZ, T.; LETELIER, C.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 1018-1025, 2009.

DANIEL, J.A.; STERLE, S.W.; MCFADDIN-BUFF, E.L.; KEISLER, D.H. Breeding ewes out-of-season using melengestrol acetate, one injection of progesterone, or a controlled internal drug releasing device. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 105-110, 2001.

DAVIES, M.C.G.; BECK, N.F.G. A comparison of plasma prolactin, LH and progesterone concentration during oestrus and early pregnancy in ewe lambs and ewes. **Animal Production**, v. 57, n.2, p. 281–286, 1993.

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, n.9, p. 1077-1082, 2008.

DIAS, F. E. F.; VILLARROEL, A. B. S.; FREITAS, V. J. F. Sincronização do estro e da ovulação em ovelhas: uma revisão. **Revista Científica de Produção Animal**, v.2, p.119-129, 2000.

D'SOUZA, K.N.; RASTLE-SIMPSON, S.L.; REDHEAD, A.K.; BAPTISTE, Q.S.; SMITH, B.; KNIGHTS, M. Gonadotropin stimulation using PG600® on reproductive success of non-lactating anestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 3-4, p. 115-120, 2014.

DOWING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. **Journal of reproduction and fertility**, Supplement 43, p. 209-227, 1991.

EVANS, A.C.O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M.P. Waves of follicle development during the estrous cycle in the sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 699-715, 2000.

EVANS, A.C.O.; FLYNN, J.D.; QUINN, K.M.; BEARD, A.P. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestogen estrus synchronization protocol in ewes. **Theriogenology**, v. 56, n. 5, p. 932-936, 2001.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 194p.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **Estatísticas FAO**, 2014. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.> Acesso em 07 de junho de 2017.

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

FIERRO, S.; OLIVERA-MUZANTE, J.; GIL, J.; VIÑOLES, C. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 630-639, 2011.

FIERRO, S.; VIÑOLES, C.; OLIVERA-MUZANTE, J. Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 167, p. 74-82, 2016.

FIERRO, S.; VIÑOLES, C.; OLIVERA-MUZANTE, J. Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 90, p. 109-113, 2017.

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

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; ZAMBRINI, F.N.; DEMCZUK, E.; VIANA, J.H.M.; PALHÃO, M.P. Induction of synchronization estrus in dairy goats with different gonadotrophins. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 50-53, 2005.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 689-703, 1995.

GÓMEZ-BRUNET, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; MONOTOR, V.; GARDE, J.; PONS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; LÓPEZ-SEBASTIAN, A. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. **Small Ruminant Research**, v. 71, n. 1-3, p. 117-122, 2007.

Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2001, p.35-41.

Granados, L.B.C.; Dias, A.J.B.; Sales, M.P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. **Capritec**. Campos dos Goytacazes, 1^a ed, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004, 513p.

HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 2, p. 404-424, 1983.

HASHEM, N.M.; EL-ZARKOUNY, S.Z.; TAHA, T.A.; ABO-ELEZZ, Z.R. Oestrus response and characterization of the ovulatory wave following oestrus synchronization using PGF2 α alone or combined with GnRH in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 84-87, 2013.

HASHIM, N.H.; SYAFNIR, S.M. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. **Biomedical Research**, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 07 de junho de 2017.

KARSCH, F. J.; BOWEN, J. M.; CARATY, A.; EVANS, N. P.; MOENTER, S. M. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 2, p. 303-309, 1997.

KHAN, T.H.; BECK, N.F.G.; KHALID, D, M. Comparison of luteal function between ewe lambs and ewes during breeding and non-breeding season. **Animal Science**, v. 98, p. 184-184, 1998.

KHAN, T.H.; 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, n. 1-2, p. 81-89, 2003.

KNIGHTS, M.; RAMGATTIE, R.; SIEW, N.; SINGH-KNIGHTS, D.; BOURNE, G. Effectiveness of a short-term treatment with progesterone injections on synchrony of lambing and fertility in tropical hair sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 1-2, p. 70-75, 2011.

KNIGHTS, M.; REDHEAD, A.; D'SOUZA, K.; BAPTISTE, Q. Effect of stimulation with a gonadotropin mixture on reproductive outcome in nulliparous ewes bred during seasonal anestrus and early breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 198-204, 2015.

KRIDLI, R.T.; AL-KHETIB, S.S. Reproductive response in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 1-2, p. 75–85, 2006.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestogen and PMSG in anestrus ewes. **Theriogenology**, v. 50, n. 3, p. 377-393, 1998.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n. 1, p. 171-178, 2001.

MALHEIROS, M. A. C.; HÖFLER, C. E.; PATIAS, J. Cadeia produtiva da ovinocultura: uma análise sob a ótica dos produtores. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 371-394, 2017.

MANES, J.; HOZBOR, F.; ALBERIO, R.; UNGERFELD, R. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 108-111, 2014.

MARTIN, G. B.; MILTON, J. T. B.; DAVIDSON, R. H.; HUNZICKER, G. E. B.; LINDSAY, D. R.; BLACHE, D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.231-245, jul. 2004.

MARTEMUCCI, G.; D'ALESSANDRO, A.G. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF_{2α}, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1-2, p. 32-39, 2011.

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.

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

OLIVERA-MUZANTE J, FIERRO S, LÓPEZ V, GIL J. Comparison of prostaglandina- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1232-1238, 2011.

OLIVERA-MUZANTE J, GIL J, VIÑOLES C, FIERRO S. Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24h or 36h following a prostaglandin F_{2α}-based protocol for timed IA in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 175-179, 2013.

ROBINSON, J.J., ASHWORTH, C.J., ROOKE, J.Á., MITCHELL, L.M., MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 259-276, 2006.

ROWE, J.D.; EAST, N.E. Comparison of two sources of gonadotropin for estrus synchronization in does. **Theriogenology**, v. 45, n. 8, p. 1569-1575, 1996.

ROY, F.; COMBES, B.; VALMAN, D.; CRIBIU, E.P.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M.C. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. **Biological Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 208-218, 1999.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F_{2α}. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 1-2, p. 47-55, 2003.

RUBIANES, E., UNGERFELD, R., IBARRA, D. Serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. **Small Ruminant Research**, v. 21, n. 2, p. 105-111, 1996.

SALEH, M.; SHAHIN, M.; WUTTKE, W.; GAULY, M.; HOLTZ, W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). **Reproduction**, v. 144, n. 1, p. 77-81, 2012.

SANTOS, I. W.; BINSFELD, L. C.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E. Fertility rates of ewes treated with medroxyprogesterone and injected with equine chorionic gonadotropin plus human chorionic gonadotropin in anoestrous season. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 4 páginas, 2010.

SANTOS-NETO, P.C.; GARCÍA-PINTOS, C.; PINCZAK, A.; MENCHACA, A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. **Livestock Science**, v. 182, p. 125-128, 2015.

SCARAMUZZI, R. J.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWING, J. A.; FINDLAY, J. A.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 5, p. 459-478, 1993.

SILVA, A. P. S. P.; SANTOS, D. V.; KOHEK JR, I.; MACHADO, G.; HEIN, H. E.; VIDOR, A. C. M.; CORBELLINI, L. G. Ovinocultura do Rio Grande do Sul: descrição do sistema produtivo e dos principais aspectos sanitários e reprodutivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1453-1458, 2013.

SOUZA, A.H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F.A.; SILVA, F.F.; ARAÚJO, R.; BO, G.A.; WILTBANK, M.C.; BARUSELLI, P.S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

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

UNGERFELD, R. Combination of the ram effect with PGF₂ α estrous synchronization treatment in ewes during the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1-2, p. 65-68, 2011.

UNGERFELD, R. Reproductive response of mature and nulliparous yearling ewes to the ram effect during the non-breeding season. **Small Ruminant Research**, v. 140, p. 37-39, 2016.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no Brasil e no mundo. **Revista Ovinos**, n.12, 2008.

VIANA, J. G. A.; REVILLION, J. P. P.; SILVEIRA, V. C. P. Alternativa de Estruturação da Cadeia de Valor da Ovinocultura no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 9, n. 1, p. 187-210, 2013.

VILARIÑO, M.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Ovarian response and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 79, n.1 p. 206-210, 2013.

VILARIÑO, M.; CUADRO, F.; SANTOS-NETO, P.C.; GARCÍA-PINTOS, C.; MENCHACA, A. Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. **Theriogenology**, v. 90, p. 164-168, 2017.

VIÑOLES, C.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 437, 1999.

VIÑOLES, 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, n. 1, p. 993-1004, 2001.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; MARTIN, G.B.; CAJARVILLE, C.; REPETTO, J.; MEIKLE, A. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. **Reproduction**, v. 129, n. 3, p. 299-309, 2005.

VIU, M. A. O.; FILHO, B. D. O.; LOPES, D. T.; VIU, A. F. M.; SANTOS, K. J. G. Fisiologia e manejo reprodutivos em ovinos: uma revisão. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 1, p. 79-98, 2006.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; KELLER-SCHOENWETTER, S.; KUNZI-RAPP, K.; MÜNSTEDT, K.; RAO, C.V.; LANG, U.; PREISSNER, K.T. Characterization of Human Chorionic Gonadotropin as a Novel Angiogenic Factor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5290-5296, 2002.

Anexos

Pelotas, 15 de dezembro de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Controle do ciclo em ovinos com foco em inseminação em tempo fixo e ressincronização**” registrada com o nº 23110.007340/2016-95, sob a responsabilidade de **Arnaldo Diniz Vieira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 12/12/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	16/12/2016 a 30/11/2019	
Espécie/linhagem/raça	Ovina/Raças comerciais	
Nº de animais	619	
Idade	8 meses a 8 anos	
Sexo	601 Fêmeas e 18 machos	
Origem	Biotério Central - UFPel	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 7340-2016**).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016