

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



Dissertação

Indutores de Ovulação em Protocolos de Manipulação de Ciclo Estral Ovino

Diego Corrêa Silveira

Pelotas, 2020

Diego Corrêa Silveira

Indutores de Ovulação em Protocolos de Manipulação de Ciclo Estral Ovino

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: Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S587i Silveira, Diego Corrêa

Indutores de Ovulação em Protocolos de Manipulação de Ciclo Estral Ovino / Diego Corrêa Silveira ; Thomaz Lucia Junior, orientador ; Rafael Gianella Mondadori, coorientador. — Pelotas, 2020.

49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. GnRH. 2. IATF. 3. Ovelhas. 4. Reprodução. 5. Sincronização. I. Lucia Junior, Thomaz, orient. II. Mondadori, Rafael Gianella, coorient. III. Título.

CDD : 636.3

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Diego Corrêa Silveira

Indutores de Ovulação em Protocolos de Manipulação de Ciclo Estral Ovino

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: 17/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária por University of Minnesota (EUA)

Prof. Dr. Gilson de Mendonça
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal
Doutor em Ciências Agrícolas por Southern Illinois University Carbondale (USA)

Prof. Dr. Sergio Farias Vargas
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as coisas boas que acontecem comigo.

À minha mãe Eneida, pelo apoio e esforço para que eu fosse atrás dos meus objetivos e realizasse meus sonhos.

Ao meu pai Volmer, que com certeza, onde estiver, está muito feliz pela minha conquista.

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

Agradecimento especial à minha namorada, Beatriz, pelo amor, companheirismo, amizade e ensinamentos que, sem dúvidas, foram um dos pilares deste trabalho.

Ao grupo Repropel, professores, pós-graduandos e estagiários, pelos ensinamentos transmitidos desde a época de estágio, companheirismo dos dias de convívio e a ajuda na execução deste trabalho.

Aos meus orientadores, Thomaz, Arnaldo, Rafael e Bernardo pelo apoio e disposição em me ajudar em todos os desafios encontrados nessa trajetória. Agradeço também todas as opiniões e conselhos que me ajudaram a crescer e aprender.

A todo pessoal do Centro Agropecuário da Palma-UFPel pelo auxílio nas atividades com os animais. Também meu muito obrigado ao Hector Caldas pela paciência e ajuda com as ovelhas.

A Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel que me proporcionou experiências incríveis e aos amigos que fiz durante esse período dentro da instituição.

A todos que fizeram parte desta trajetória comigo e que contribuíram de alguma forma.

Muito obrigado a todos!

***“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”
(Roberto Shinyashiki)***

Resumo

SILVEIRA, Diego Corrêa. **Indutores de Ovulação em Protocolos de Manipulação de Ciclo Estral Ovino**. 2020. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A sincronização de estro é uma biotecnologia utilizada para incremento na produtividade, permitindo a realização da IATF. Progestágenos e eCG são empregados para proporcionar adequada sincronização da ovulação, porém existe uma pressão crescente da opinião pública para reduzir a produção de eCG. Como alternativa ao eCG, em ovinos, testou-se o estradiol e análogo sintético do GnRH, como indutores da ovulação. Objetivou-se determinar a taxa de crescimento folicular e ovulação com aplicação de eCG, benzoato de estradiol e cipionato de estradiol, antes da IATF e avaliar o efeito de FSH dentro e fora da estação reprodutiva. No experimento 1 as ovelhas (n=22), receberam MAP e cloprostenol na retirada. Foram divididas em quatro grupos (CN; n=5), (CP; n=5), (CE, n=6) e (BE, n=6). No experimento 2, estudo 1 (fora da estação, n=28) permaneceram com o Primer-PR por sete dias. Os animais foram divididos em quatro grupos Controle, eCG, FSH10 e FSH15. No estudo 2 (fora da estação, n=25) permaneceram com o Primer-PR por 14 dias e divididos em tratamentos iguais ao do estudo 1. No estudo 3 (dentro da estação, n=147), permaneceram com o Primer-PR por 14 dias. Divididos em três grupos: Controle, eCG e FSH10. O experimento 3 foi realizado fora da estação, n=27 foram divididas em 3 grupos: eCG (n=8), BE (N=9) e GnRH (n=10). Não foi possível observar efeito do FSH e do eCG na manifestação de estro (P4-14D) fora da estação reprodutiva, o uso de gonadotrofinas aumentou a taxa de crescimento folicular fora da estação, e somente o eCG foi capaz de induzir a ovulação. Em um outro trabalho, inicialmente todas as ovelhas (n=115) tiveram o estro sincronizado através de MAP, no momento da retirada receberam 300UI de eCG e realizada a IATF1 48 horas após a remoção. Avaliou-se o uso do GnRH em protocolo de ressincronização determinando as taxas de manifestação de estro e prenhez. Com base na hipótese da possibilidade de uma nova inseminação (IATF2) sem determinar se as fêmeas estavam ou não gestando após a IATF1. Os animais foram divididos em dois grupos, controle (n=59) e GnRH (n=56). A aplicação de GnRH não foi eficiente em induzir a ovulação no protocolo de ressincronização em ovelhas. Durante a estação reprodutiva, o uso de gonadotrofinas não aumentou a taxa de prenhez. Fora da estação o grupo eCG apresentou maior concentração de P4, e o grupo GnRH não foi eficiente em induzir estro.

Palavras-chave: GnRH; IATF; ovelhas; reprodução; sincronização

Abstract

SILVEIRA, Diego Corrêa. **Ovulation Inducers in Ewe Estrous Cycle Handling Protocols**. 2020. 49f. Dissertation (Master degree em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Estrus synchronization is a biotechnology used to increase productivity, allowing the FTAI to be performed. Progestogens and eCG are used to provide adequate synchronization of ovulation, but there is increasing pressure from public opinion to reduce the production of eCG. As an alternative to eCG, in sheep, estradiol and synthetic GnRH analog were tested as an ovulation inducer. The objective was to determine the rate of follicular growth and ovulation with the application of eCG, estradiol benzoate and estradiol cypionate, before FTAI and to evaluate the effect of FSH inside and outside the reproductive season. In experimente 1 the sheep (n = 22) received MAP and cloprostenol at removal. They were divided into four groups (CN; n = 5), (CP; n = 5), (CE, n = 6) and (BE, n = 6). In experiment 2, study 1 (out-of-the season, n = 28) remained with Primer-PR for seven days. The animals were divided into four Control groups, eCG, FSH10 and FSH15. In study 2 (out-of-the season, n = 25) they remained with Primer-PR for 14 days and divided into treatments equal to that of study 1. In study 3 (in-season, n = 147), they remained with Primer-PR for 14 days. Divided into three groups: Control, eCG and FSH10. Experiment 3 was performed at the counter station, n = 27 were divided into 3 groups: eCG (n = 8), BE (N = 9) and GnRH (n = 10). It was not possible to observe the effect of FSH and eCG on the manifestation of estrus (P4-14D) outside the reproductive season, the use of gonadotropins increased the rate of follicular growth outside the season, and only eCG was able to induce ovulation. In another study, initially all sheep (n = 115) had estrus synchronized through MAP, at the time of removal they received 300UI of eCG and FTAI1 was performed 48 hours after removal. The use of GnRH in a resynchronization protocol was evaluated, determining the rates of estrus and pregnancy manifestation. Based on the hypothesis of the possibility of new insemination (FTAII2) without determining whether or not the females were pregnant after FTAI1. The animals were divided into two groups, control (n = 59) and GnRH (n = 56). The application of GnRH was not efficient in inducing ovulation in the sheep resynchronization protocol. During the reproductive season, the use of gonadotropins did not increase the pregnancy rate. Out-of-the season, the eCG group had a higher concentration of P4, and the GnRH group was not efficient in inducing estrus.

Keywords: FTAI; GnRH; reproduction; sheep; synchronization

Lista de Figuras

Artigo

- Figura 1 Procedimentos realizados no experimento 1, onde os animais (n=22), receberam uma esponja intravaginal impregnada com 60mg de MAP, mantida por 13 dias (D-13). No D0 todos os animais receberam 120 µg de Cloprostenol divididos quatro grupos: Controle negativo (CN; n=5), Controle positivo (CP; n=5), receberam 300 UI de eCG e Grupo CE (n=6) receberam 250µg de CE e Grupo BE (n=6) receberam 250 µg de BE..... 23
- Figura 2 Procedimentos realizados no experimento 2, fora da estação reprodutiva, onde os animais (n=28) permaneceram com o Primer-PR por sete dias. Divididos em quatro grupos de sete animais: sem aplicação de gonadotrofina (Controle); ou com aplicação de 400 UI de e eCG; 10 mg de FSH e 15 mg de FSH..... 24
- Figura 3 Procedimentos realizados no experimento 3, fora da estação reprodutiva, onde os animais (n=25) permaneceram com o Primer-PR por quatorze dias. Divididos em quatro grupos: sem aplicação de gonadotrofina (Controle); ou com aplicação de 400 UI de eCG; 10 mg de de FSH e 15 mg de FSH..... 25
- Figura 4 Procedimentos realizados no experimento 4, dentro da estação reprodutiva, onde os animais (n=147), permaneceram com o Primer-PR por quatorze dias. Divididos em três grupos: sem gonadotrofina (Controle; n=50), com aplicação de 300 UI de eCG (n=48) ou 10 mg de FSH10..... 25

Figura 5	Procedimentos realizados no experimento 5, fora da estação reprodutiva, fez-se coleta de sangue (n=27) para dosagem de progesterona e divididas em 3 grupos: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10), sincronizadas com MAP-12 dias. No D12 os animais receberam: grupo eCG: 0,5ml de PGf e 300UI de eCG; grupo BE: 0,5 ml de PGf e 10 mg de FS; grupo GnRH: 0,5 de PGf e 10 mg de FSH. No D13 foi aplicado no grupo BE 0,25 ml de BE, 36 horas após a retirada das esponjas foi aplicado no grupo GnRH 4,2 µg de Buserelina.....	26
Figura 6	Crescimento folicular (mm) determinado por ultrassonografia em ovelhas dos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP), Cipionato de estradiol (CE) e Benzoato de estradiol (BE), às 24 horas (a) e às 72 horas (b) - Experimento 1.....	27
Figura 7	Frequência de estros identificados por rufião e de ovulações confirmadas por laparoscopia no D7, em ovelhas dos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP), Cipionato de estradiol (CE) e Benzoato de estradiol (BE) - Experimento 1.....	28
Figura 8	Níveis plasmáticos de P4 em ovelhas sincronizadas com MAP-12 dias e submetidas a tratamento fora da estação reprodutiva: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10) – Experimento 5.....	30
Figura 9	Frequência de ovelhas com níveis de P4 >1ng/ml, sincronizadas com MAP-12 dias e submetidas a tratamento fora da estação reprodutiva: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10) - Experimento 5.	31
Figura 10	Frequência de estros em ovelhas com níveis de P4 >1ng/ml, sincronizadas com MAP-12 dias e submetidas a tratamento fora da estação reprodutiva: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10) - Experimento 5.....	31

Short Communication

Figura 1	Organograma dos procedimentos realizados para primeira e segunda inseminação em tempo fixo (IATF), com ou sem aplicação de GnRH. Organograma dos procedimentos realizados	38
----------	---	----

	para primeira e segunda inseminação em tempo fixo (IATF), com ou sem aplicação de GnRH.....	
Figura 2	Taxa de prenhez após duas inseminações artificiais em tempo fixo, com ou sem administração de um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).....	40
Figura 3	Distribuição de retornos ao estro após a realização da primeira inseminação artificial em tempo fixo (IATF1).....	40
Figura 4	Distribuição de retornos ao estro após a realização da segunda inseminação artificial em tempo fixo (IATF2), com ou sem administração de um análogo de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Taxa de crescimento folicular, manifestação de estro e ovulação em ovelhas submetidas a protocolo, fora da estação reprodutiva, com uso de Primer-PR por sete dias. Divididos em quatro grupos de sete animais: sem aplicação de gonadotrofina (Controle); ou com aplicação de 400 UI de eCG; 10 mg de FSH e 15 mg de FSH – Experimento 2.....	29
Tabela 2	Taxa de manifestação de estro em ovelhas submetidas a protocolo, fora da estação reprodutiva, com uso de Primer-PR por quatorze dias. Divididos em quatro grupos: sem aplicação de gonadotrofina (Controle); aplicação de 400 UI de eCG; 10 mg de FSH e 15 mg de FSH – Experimento 3.....	29
Tabela 3	Taxa de prenhez e manifestação de estro em ovelhas submetidas a protocolo, dentro da estação reprodutiva, com uso de Primer-PR por quatorze dias. Divididos em três grupos: Controle (sem gonadotrofinas); eCG (300 UI); e FSH (10 mg) - Experimento 4.....	29

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg	Microgramas
µL	Microlitros
BE	Benzoato de Estradiol
CAP	Centro Agropecuário da Palma
CE	Cipionato de Estradiol
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CL	Corpo(s) Lúteo(s)
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
D	Dia
E2	Estradiol
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
G	Força G
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
h	Hora(s)
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	Intramuscular
LH	Hormônio Luteinizante
MAP	Acetato de Medroxiprogesterona
mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ng	Nanogramas

P4	Progesterona
PGF	Prostaglandina F2 α
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UI	Unidades Internacionais

Lista de Símbolos

=	Igual
%	Porcento
β	Beta
®	Marca Registrada
\pm	Mais ou Menos
>	Maior
\leq	Menor ou Igual
°	Graus
'	Minutos
"	Segundos
°C	Graus Celsius

Sumário

1 Introdução.....	15
2 Artigos.....	19
2.1 Artigo 1.....	19
2.2 Artigo 2 (Short Communication).....	34
3 Considerações Finais.....	43
Referências.....	45

1 Introdução

A ovinocultura é uma das atividades pecuárias mais antigas da história, hoje difundida por todo o globo terrestre, e um dos ramos da pecuária que apresenta relativo crescimento no cenário mundial e nacional, com taxas de crescimento de 1,5% ao ano. O Brasil tem o 18º maior rebanho do mundo (FAO, 2016), com pouco mais de 18,9 milhões de ovinos de acordo com o último censo realizado pelo IBGE. O Rio Grande do Sul, onde a criação de ovinos tem importância econômica e cultural, é o segundo estado brasileiro com o maior número de ovinos, com mais de 3,1 milhões de animais (IBGE, 2018). A produção mundial de carne ovina atingiu, em 2013, a marca de 8,6 milhões de toneladas (FAO, 2016).

A criação de ovinos pode ser desenvolvida em todo território brasileiro, devido a adaptabilidade de algumas raças a ambientes mais rústicos e a capacidade de gerar proteína de alta qualidade, a partir da ingestão de alimentos fibrosos e de baixo teor nutritivo (COSTA *et al.*, 2011). Os principais objetivos dos produtores de ovinos são melhorar o desempenho reprodutivo, aumentar a porcentagem de cordeiros desmamados e o número de cordeiros comercializados, fatores determinantes na lucratividade da indústria atual e que ajudará no sucesso e sustentabilidade a longo prazo da atividade, que hoje conta com uma taxa de assinalação (cordeiros que sobrevivem até o desmame) abaixo de 60%.

Atualmente, a atividade apresenta aumento na produção e comercialização de carne, principalmente pelo consumo da população urbana. O Brasil é um grande consumidor de produtos de origem ovina, porém a cadeia produtiva nacional não é capaz de atender as demandas, sendo necessário grande volume de importações (SOUZA *et al.*, 2016). As importações de carne ovina oriundas do Uruguai, enfraquece nosso sistema de produção, que apresenta baixa escala de produção, além da oferta sazonal de cordeiro.

Os ovinos são poliéstricos estacionais de dias curtos, ou seja, a alta performance reprodutiva das fêmeas e reprodutores é evidente durante o outono e inverno. Esse fenômeno ocorre em regiões de clima temperado, onde a variação de luz entre o dia e a noite é substancial (FONSECA *et al.*, 2005).

O ciclo estral é regido pela liberação de hormônios, que estimulam e inibem a produção e liberação de outros. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é secretado pelo hipotálamo e estimula a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pela adenohipófise. O FSH atua sobre os ovários através da estimulação do desenvolvimento folicular ovariano. A sua produção é regulada pela ação do estradiol e a inibina, hormônios que atuam a nível hipofisário (BAIRD *et al.*, 1991). Em um ambiente com ausência de P4, o aumento da concentração plasmática de estradiol tem efeito direto sobre o aumento da frequência de GnRH e LH. O pico pré-ovulatório de LH consiste em um pulso de liberação de LH (RAWLINGS e COOK, 1993) e ovulação. Quando há níveis altos de P4 associados à presença de estradiol, esta inibe a liberação GnRH.

O melhoramento genético é uma das bases da produção e reprodução dessa espécie e encontra na técnica de inseminação artificial (IA) uma das principais ferramentas, criando a oportunidade de ser usada em ovelhas utilizando sêmen de carneiros superiores e aumentando a eficiência geral (CLINE *et al.*, 2001). Sua adoção é facilitada pelas técnicas de sincronização de estro e de ovulação, visando à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), onde a detecção de estro é dispensável, e resultando em parições sincronizadas de produtos melhorados. É uma importante ferramenta no sistema de produção animal, com um impacto direto sobre o custo, no entanto, para viabilizar comercialmente a IATF, é necessário assegurar taxas aceitáveis de prenhez e ser economicamente viável. Diferentes protocolos foram desenvolvidos para indução de estro em ovinos (ABECIA *et al.*, 2011), mas as informações sobre seu custo-benefício, orientações ao produtor e aplicabilidade a campo é muito escassa.

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. A maioria dessas técnicas são pouco utilizadas no Brasil, sendo mais empregadas em criações intensivas e por grandes produtores, porém a difusão destas no meio rural, possibilita uma uniformidade da produção e aumento no atendimento da demanda comercial, gerando maior lucratividade no setor (ASSUNÇÃO, 2017).

Tratamentos tradicionais para sincronização da ovulação em ovelhas consistem em esponjas intravaginais contendo progesterona por 12 a 14 dias (EVANS

et al., 2001). Também usados em conjunto com gonadotrofina coriônica equina (eCG), 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, o qual atua induzindo desenvolvimento de folículos durante os períodos de inatividade hipotalâmico-hipofisária, produzindo taxas aceitáveis de prenhez, tanto dentro como fora da estação reprodutiva. Mesmo assim, o uso repetido de eCG tem sido associado a uma resposta imune em ovelhas e cabras (ROY *et al.*, 1999a; ROY *et al.*, 1999b) e desenvolvimento de cistos foliculares (VIÑALES *et al.*, 2001), seguido de baixas taxas de prenhez. Além disso, o tratamento com P4-eCG tem sido limitado devido a problemas de saúde pública (MENCHACA e RUBIANES, 2004) e questões de bem-estar animal.

O uso do GnRH é chave para o controle da função reprodutiva em todas as espécies de vertebrados (BAKKER e BAUM, 2000), produzido e liberado pelo hipotálamo e induz a liberação de hormônio luteinizante (LH) pela adenohipófise (THATCHER *et al.*, 2002), pode induzir a ovulação. O GnRH induz uma nova onda folicular, entretanto o desenvolvimento de uma nova onda fica inalterado se a aplicação for realizada antes do estabelecimento da dominância folicular. O GnRH induz o pico pré-ovulatório de LH duas horas após a injeção intramuscular em ovelhas durante a estação reprodutiva (RUBIANES *et al.*, 1998). Seu emprego tem sido sugerido em substituição ao eCG em protocolos de indução e sincronização de estro e superovulação em ovelhas (MENCHACA *et al.*, 2010). REYNA *et al.* (2007) sugere que a administração de GnRH em relação ao acasalamento seria uma opção prática para melhorar o aumento de LH e sincronia da ovulação em protocolos de IATF.

Em ovinos, o benzoato de estradiol (BE) foi testado apenas para induzir a onda folicular, que começa aproximadamente de 4 a 6 dias após a aplicação (BARRETT *et al.*, 2008). A implementação de BE em vez de eCG foi ineficaz e resultou em baixas taxas de prenhez, porém o BE possui baixo custo e é usado rotineiramente em protocolos de IATF em vacas, induzindo o pico pré-ovulatório de LH (CASTILHO *et al.*, 2000). Segundo BARRETT *et al.* (2008) os picos induzidos de LH foram menores e ocorreram em tempo variável, mas mais tarde do que nas ovelhas que receberam somente estradiol, assim a combinação de estradiol e MAP teve um feedback negativo mais poderoso sobre a secreção de FSH, dando maior supressão e picos induzidos atrasados. A progesterona facilita efeitos do feedback do estradiol na secreção de FSH em ovelhas (RAWLINGS *et al.*, 1984).

O hormônio folículo estimulante (FSH) poderia ser utilizado como uma alternativa ao uso do eCG nos tratamentos de sincronização do estro, uma vez que este possui uma ação semelhante ao FSH e LH, sobretudo de FSH. Taxas de prenhez aceitáveis já foram obtidas com o uso de associação de progestágeno a uma única aplicação de FSH (BOSCOS *et al.*, 2002), contudo, tais resultados foram obtidos em programa de monta natural, que permite uma maior dispersão das ovulações sem grandes influências na fertilidade subsequente.

Portanto, os objetivos do presente estudo foram determinar as taxas de manifestação de estro e de prenhez em ovelhas que retornaram ou não ao estro após a realização de uma primeira IATF com a utilização de um indutor de ovulação ou não e determinar a taxa de crescimento folicular e ovulação em animais com estro sincronizado com progestágeno (MAP), sem qualquer outro tratamento, com aplicação de eCG, Benzoato de estradiol e Cipionato de Estradiol, antes da IATF. Também se avaliou o efeito de FSH em diferentes protocolos de sincronização de estro em ovelhas dentro e fora da estação reprodutiva, além do uso de GnRH como indutor de ovulação fora da estação reprodutiva.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Diferentes indutores de ovulação em protocolos de controle do ciclo estral ovino

Different ovulation inducers in protocols to control the estrous cycle in ewes

Diego Corrêa Silveira, Rafael Gianella Mondadori, Arnaldo Diniz Vieira, Thomaz Lucia Junior

Será submetido à revista Ciência Rural

Diferentes indutores de ovulação em protocolos de controle do ciclo estral ovino

Different ovulation inducers in protocols to control the estrous cycle in ewes

SILVEIRA, D.C.^{1,2}, MONDADORI, R.G.¹, VIEIRA, A.D.¹, LUCIA T. Jr.^{1*}

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

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

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

Resumo

A sincronização de estro é uma biotecnologia utilizada para incremento na produtividade, permitindo a realização de IATF e dispensando a necessidade de observação de estro. Progestágenos e eCG são empregados para proporcionar o adequado desenvolvimento folicular e ovulação sincronizada. Porém, existe uma pressão crescente da opinião pública para reduzir a produção de eCG. Como alternativa, foi avaliada a aplicação de FSH em ovelhas sincronizadas dentro e fora da estação reprodutiva, utilizando um dispositivo intravaginal, assim como o uso de GnRH em protocolos de sincronização de estro buscando induzir e sincronizar a ovulação com o objetivo de determinar a taxa de crescimento folicular e ovulação em animais com estro sincronizado com progestágeno (MAP), sem qualquer outro tratamento, com aplicação de eCG, Benzoato de estradiol e Cipionato de Estradiol, antes da IATF. Também se avaliou o efeito de FSH em diferentes protocolos de sincronização de estro em ovelhas dentro e fora da estação reprodutiva, além do uso de GnRH como indutor de ovulação fora da estação. No experimento 1 as ovelhas (n=22), receberam MAP e cloprostenol na retirada. Foram divididas em quatro grupos: (CN; n=5), (CP; n=5), (CE, n=6) e (BE, n=6). No experimento 2, (fora da estação, n=28) permaneceram com o Primer-PR por sete dias. Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle, eCG, FSH10 e FSH15. No experimento 3 (fora da estação, n=25) permaneceram com o Primer-PR por 14 dias e divididos em tratamentos iguais ao experimento 2. No experimento 4 (dentro da estação, n=147), permaneceram com o Primer-PR por 14 dias. Divididos em três grupos: Controle, eCG e FSH10. O experimento 5 foi

realizado fora da estação, n=27 foram divididas em 3 grupos: eCG (n=8), BE (N=9) e GnRH (n=10). Não foi possível observar efeito do FSH e do eCG na manifestação de estro (P4-14D) fora da estação reprodutiva, o uso de gonadotrofinas aumentou a taxa de crescimento folicular fora da estação, e somente o eCG foi capaz de induzir a ovulação. Durante a estação reprodutiva, o uso de gonadotrofinas não aumentou a taxa de prenhez. Fora da estação reprodutiva o grupo eCG apresentou maior concentração de P4 e o grupo GnRH não foi eficiente em induzir estro.

Palavras-chave: estradiol; GnRH; indução da ovulação; ovinos; reprodução.

Abstract

Oestrus synchronization is a biotechnology used to increase productivity, allowing the performance of FTAI and eliminating the need for oestrus observation. The use of progestogens and eCG are used to provide adequate follicular development and synchronized ovulation. However, there is increasing pressure from public opinion to reduce eCG production. As an alternative, the application of FSH in sheep synchronized inside and outside the breeding season was evaluated, using an intravaginal device, as well as the use of GnRH in estrus synchronization protocols seeking to induce and synchronize ovulation in order to determine the rate of follicular growth and ovulation in animals with estrus synchronized with progestagen (MAP), without any other treatment, with application of eCG, estradiol benzoate and estradiol cypionate, before FTAI. The effect of FSH in different estrus synchronization protocols in sheep inside and outside the breeding season was also evaluated, in addition to the use of GnRH as an ovulation inducer out-of-the season. In exp.1 the sheep (n = 22) received MAP and cloprostenol at removal. They were divided into four groups (CN; n = 5), (CP; n = 5), (CE, n = 6) and (BE, n = 6). In exp.2, (out-of-the season, n = 28) remained with Primer-PR for seven days. The animals were divided into four Control groups, eCG, FSH10 and FSH15. In exp.3, (out-of-the season, n = 25) they remained with Primer-PR for 14 days and divided into treatments equal to that of exp. 2. In exp. 4 (in-season, n = 147), they remained with Primer-PR for 14 days. Divided into three groups: Control, eCG and FSH10. Exp.5 was performed at the counter station, n = 27 were divided into 3 groups: eCG (n = 8), BE (N = 9) and GnRH (n = 10). It was not possible to observe the effect of FSH and eCG on the manifestation of estrus (P4-14D) outside the reproductive season, the use of gonadotropins increased the rate of follicular growth outside the season, and only eCG was able to induce ovulation. During the reproductive season, the use of gonadotropins did not increase the pregnancy rate. Out-of-the season, the eCG group showed a higher concentration of P4 and the GnRH group was not efficient in inducing estrus.

Keywords: estradiol; GnRH; ovulation induction; sheep; reproduction.

Introdução

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) representa uma ferramenta prática em programas genéticos que permitem concentrar o período de serviço e elimina a necessidade de detecção de estro. No entanto, envolve tratamentos hormonais para garantir a sincronização da ovulação e taxas aceitáveis de prenhez. Em bovinos o efeito dos diferentes tipos de estradiol disponíveis no mercado sobre o desenvolvimento folicular e ovulação em protocolos de IATF são amplamente conhecidos, diferente do que acontece em ovinos onde não se sabe o efeito dos ésteres benzoato e cipionato de estradiol.

Até o momento os resultados são muito variáveis, mas sua eficiência pode ser incrementada com a adição de hormônios indutores de ovulação, como o Estradiol 17 β (BO et al., 1994) ou Benzoato de Estradiol (SÁ FILHO et al., 2004) que induzem, eficazmente, a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular e estimulando descargas de LH em concentrações semelhantes ao pico pré-ovulatório fisiológico. Porém, não existem informações a respeito de que o Cipionato de Estradiol (CE), tenha essa mesma capacidade.

A característica imunogênica (DRION et al., 2001) e as crescentes restrições à produção do eCG, geram a necessidade da identificação de outro hormônio para uso na estimulação de crescimento folicular final e da ovulação em ovelhas. Como alternativa, foi avaliada a aplicação de FSH (Folltropin-V, Agener União, São Paulo/SP, Brasil) em ovelhas sincronizadas dentro e fora da estação reprodutiva, utilizando um dispositivo intravaginal (Primer-PR, Agener União, São Paulo/SP, Brasil).

O uso de GnRH em protocolos de sincronização de estro busca induzir e sincronizar a ovulação. O momento da inseminação e o uso de protocolos precisos e eficazes de controle da ovulação em ovinos, em particular o uso de GnRH, podem contribuir para melhorar as taxas de fertilização (MENCHACA et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi determinar a taxa de crescimento folicular e ovulação em animais com estro sincronizado com progestágeno (MAP), sem qualquer outro tratamento, com aplicação de eCG, Benzoato de estradiol e Cipionato de Estradiol, antes da IATF. Também se avaliou o efeito de FSH em diferentes protocolos de sincronização de estro em ovelhas dentro e fora da estação reprodutiva, além do uso de GnRH como indutor de ovulação na contra-estação.

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Processo - 73402 CEEA-UFPEL). Os animais utilizados eram oriundos do Centro Agropecuário da Palma e declarados aptas à reprodução através de exame ginecológico.

Experimento 1

Foi utilizado no estudo ovelhas cíclicas (n=22), aptas à reprodução através de exame ginecológico localizadas no Centro Agropecuário da Palma (CAP-UFPEL) onde receberam uma esponja intravaginal impregnada com 60mg de MAP, mantida por 13 dias (D-13). No dia da remoção da esponja (D0) todos os animais receberam 120 µg de Cloprostenol sódico (Estron®, Agener) e foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: No D0 os animais do Controle negativo (CN; n=5), não receberam hormônios adicionais; Controle positivo (CP; n=5), receberam 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis) e os animais do Grupo Cipionato de Estradiol (n=6) receberam 250µg de CE i.m. (ECP®, Zoetis). Vinte e quatro horas após (D1), os animais do Grupo Benzoato de Estradiol (n=6) receberam 250 µg de BE, i.m. (Gonadiol®, Zoetis). O desenvolvimento folicular foi avaliado diariamente por ultrassonografia transretal desde o D0 até o desaparecimento do folículo ovulatório ou até o D4 (Figura 5). O estro foi identificado com auxílio de rufião com colete marcador. A presença e número de corpos lúteos (CLs) foi confirmada por laparoscopia no D7. Os dados foram avaliados por ANOVA e comparação de médias pelo teste T-Student.

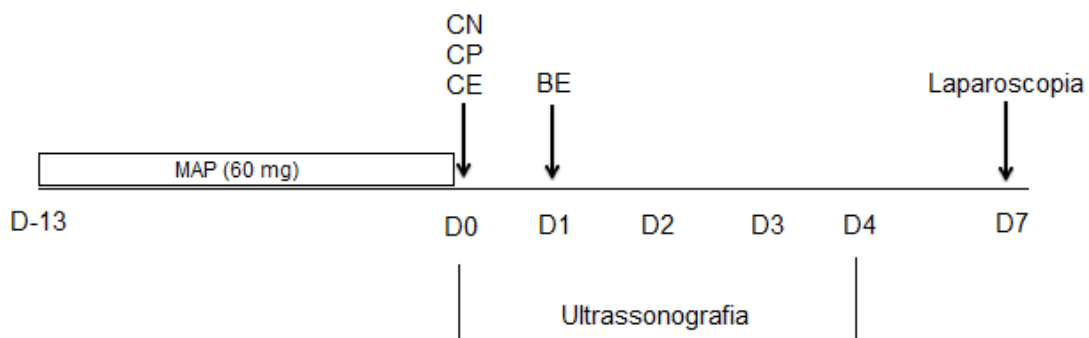


Figura 1. Procedimentos do experimento 1, onde os animais (n=22), receberam uma esponja intravaginal impregnada com 60mg de MAP, mantida por 13 dias (D-13). No D0 todos os animais receberam 120 µg de Cloprostenol divididos quatro grupos: Controle negativo (CN;

n=5), Controle positivo (CP; n=5), receberam 300 UI de eCG e Grupo CE (n=6) receberam 250µg de CE e Grupo BE (n=6) receberam 250 µg de BE.

Experimento 2

Fora da estação, os animais (n=28) permaneceram com o Primer-PR por sete dias. No momento da remoção, os animais foram divididos em quatro grupos (n=7 cada): Controle, sem aplicação de gonadotrofina; ou com aplicação de 400 UI de eCG (Novormon® Zoetis; eCG); 10 mg de FSH (Folltropin®, Agener União; FSH10) e 15 mg de FSH (Folltropin®, Agener União; FSH15). Durante 5 dias, foi realizada observação do estro diariamente e o crescimento folicular e a ovulação foram avaliadas por ultrassonografia transretal (Figura 2).

Experimento 3

Fora da estação, os animais (n=25) permaneceram com o Primer-PR por 14 dias e posteriormente foram divididos em tratamentos iguais ao do experimento 2 (Figura 3).

Experimento 4

Dentro da estação, os animais (n=147), permaneceram com o Primer-PR por 14 dias (Figura 4). No momento da remoção, os animais foram divididos em três grupos: Controle (sem gonadotrofina, n=50); eCG (300 UI de Novormon® Zoetis; n=48), ou FSH10 (10mg de Folltropin®, Agener União; n=49). O cio foi detectado através de rufião (n=2). A IATF cervical superficial foi realizada 54h após a retirada do Primer, com sêmen fresco (200×10^6 espermatozoides). O diagnóstico de gestação foi realizado 25 dias após a IATF (Figura 8).

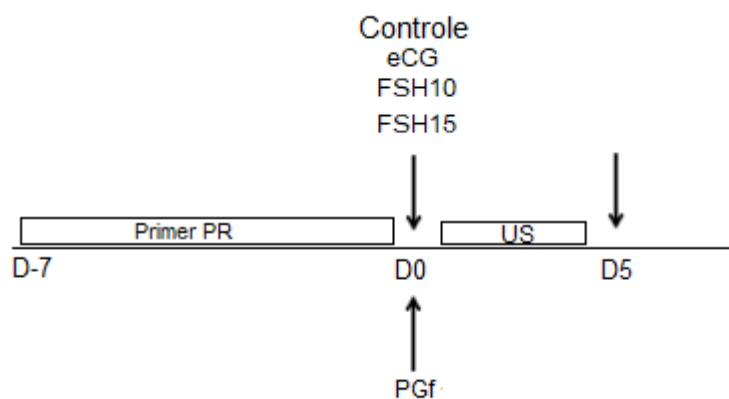


Figura 2. Procedimentos do experimento 2, fora da estação reprodutiva (n=28; 4 grupos de sete animais). Controle: sem gonadotrofinas; 400 UI de eCG; 10 mg de FSH; e 15 mg de FSH.

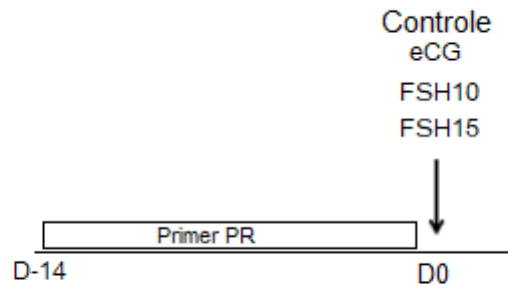


Figura 3. Procedimentos do experimento 3, fora da estação reprodutiva, onde os animais (n=25) permaneceram com o Primer-PR por quatorze dias. Quatro grupos: Controle (sem aplicação de gonadotrofinas); ou com aplicação de 400 UI de eCG; 10 mg de de FSH; e 15 mg de FSH.

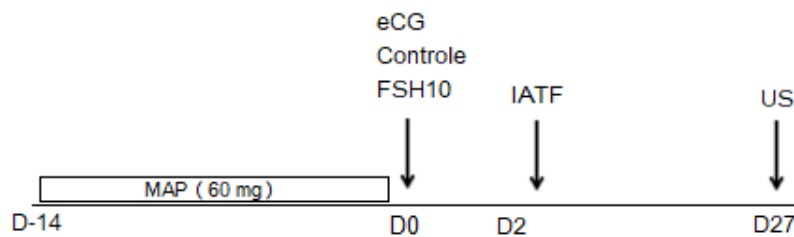


Figura 4. Procedimentos do experimento 4, dentro da estação reprodutiva, onde os animais (n=147), permaneceram com o Primer-PR por quatorze dias. Três grupos: Controle (sem gonadotrofinas, n=50), com aplicação de 300 UI de eCG (n=48), e 10 mg de FSH10 (n=49).

Experimento 5

No estudo realizado fora da estação, fez-se coleta de sangue para dosagem de progesterona de 27 ovelhas e posteriormente divididas aleatoriamente em 3 grupos: eCG (n=8), BE (N=9) e GnRH (n=10) e tiveram o estro sincronizado através da inserção de esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (D0) mantidas por doze dias. No momento da retirada das esponjas (D12) os animais receberam: grupo eCG: 0,12 mg de PGf (0,5 ml de Estron®, Agener União) e 300UI de eCG (Novormon®, Zoetis); grupo BE: 0,12 mg de PGf (0,5 ml de Estron®) e 10 mg de FSH (Folligon®, MSD Saúde Animal);

grupo GnRH: 0,12 mg de PGf (0,5 ml de Estron®) e 10 mg de FSH (Folligon®) mostrado na figura 5.

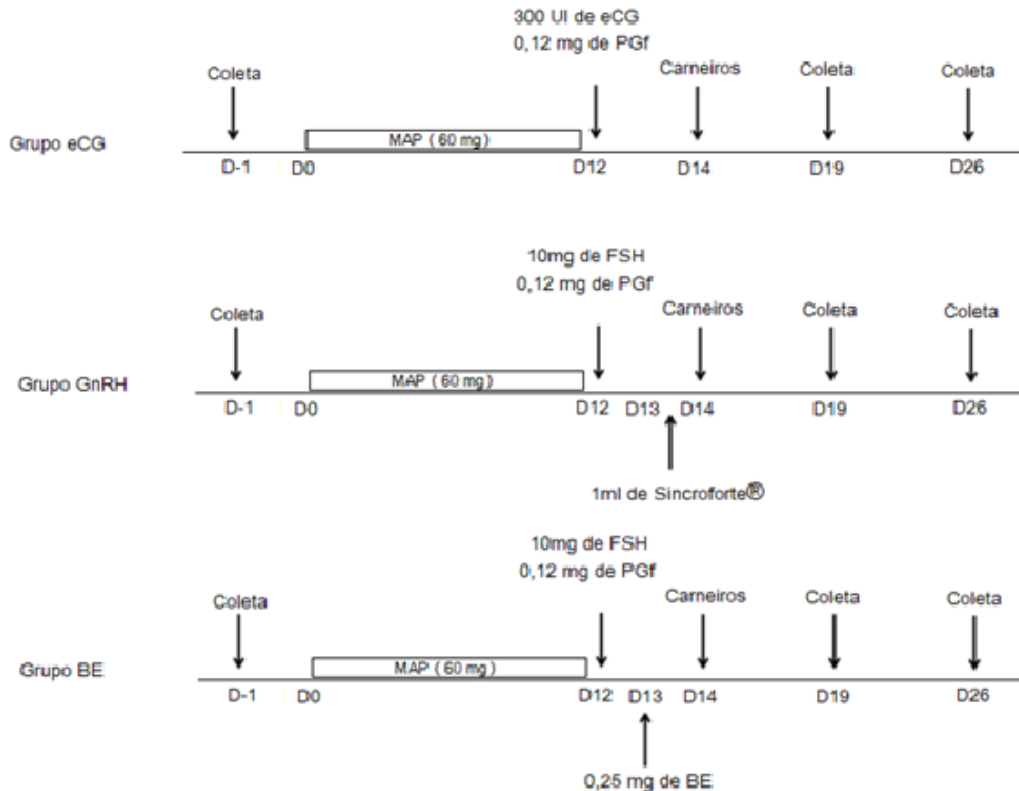


Figura 5. Procedimentos do experimento 5, fora da estação, fez-se coleta de sangue (n=27) para dosagem de progesterona e divididas em 3 grupos: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10), sincronizadas com MAP-12 dias. No D12 os animais receberam: grupo eCG: 0,5ml de PGf e 300UI de eCG; grupo BE: 0,5 ml de PGf e 10 mg de FSH; grupo GnRH: 0,5 de PGf e 10 mg de FSH. No D13 foi aplicado no grupo BE 0,25 ml de BE, 36 horas após a retirada das esponjas foi aplicado no grupo GnRH 4,2 µg de Buserelina.

No D13 foi aplicado no grupo BE 0,25 mg de BE (0,25ml de RicBEc, Tecnopec), 36 horas após a retirada das esponjas foi aplicado no grupo GnRH 4,2 µg de Buserelina (1ml de SincroForte®, Ouro Fino Saúde Animal). No D14 foram soltos carneiros (n=2) com a região esternal pintada com uma mistura de óleo vegetal e tinta xadrez para a avaliação da distribuição de cios. Amostras de sangue foram novamente coletadas no D19 e D26 por punção da veia jugular, utilizando tubos (sem anticoagulante) com um sistema de vácuo. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 g por 15 min, o soro foi separado e armazenado até a análise de

progesterona. A concentração sérica de P4 foi determinada pela técnica de quimioluminescência, realizado em um laboratório comercial.

Análises estatísticas

Em todos os experimentos, variáveis contínuas foram avaliadas pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando foi detectada ausência de normalidade, transformações foram realizadas. Posteriormente, estas respostas foram comparadas entre os tratamentos através do teste de t ou de análise de variância. Comparações entre médias foram conduzidas pelo teste de Tukey. As frequências foram comparadas entre tratamentos pelo teste de qui-quadrado.

Resultados e Discussão

Experimento 1

Quando testado em ovelhas cíclicas em bom estado nutricional, independente da utilização de gonadotrofinas, há desenvolvimento folicular. O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi de $5,5 \pm 0,3$ mm, não diferindo entre os grupos ($p > 0,05$). No D1, o crescimento folicular do grupo CP foi maior do que nos demais ($p = 0,001$). No D2, quando considerado o momento (24, 48, 72h) em relação ao crescimento do maior folículo, o grupo BE teve maior crescimento folicular ($p=0,001$). Já no D3, o grupo CN apresentou maior crescimento ($p = 0,06$) em relação aos demais (Figura 6), que não diferiram entre si ($p > 0,05$). (Figura 6). Segundo MENCHACA and RUBIANES (2004), no mínimo um folículo por onda deve ter um diâmetro ≥ 5 mm. O maior folículo de cada onda cresce por 5 a 7 dias, com uma taxa de crescimento próxima de 1 mm por dia.

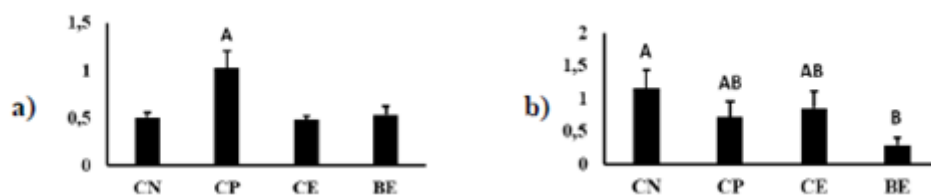


Figura 6. Crescimento folicular (mm) determinado por ultrassonografia em ovelhas dos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP), Cipionato de estradiol (CE) e Benzoato de estradiol (BE), às 24 horas (a) e às 72 horas (b) - Experimento 1.

As frequências de estros e ovulações foram semelhantes entre os tratamentos CN, CP, CE e BE (80%; 4/5, 100%; 5/5, 83%; 5/6 e 83%; 5/6) e (80%; 4/5, 100%; 5/5, 66,6%; 4/6 e 83%; 5/6), respectivamente (Figura 7). Na avaliação laparoscópica no D7, as ovelhas dos grupos CN, CP, CE e BE apresentaram 1,25, 1,25, 1 e 1 CL, respectivamente. Em bovinos o CE apresenta resposta mais variável em termos de sincronia de onda e ovulação quando comparado ao BE e o 17β -estradiol (COLAZO et al., 2003). MAFFILI et al. (2005), demonstraram que o uso de CE e progesterona foi efetivo em sincronizar a emergência de nova onda de crescimento folicular, em cabras. Por outro lado, TAKADA (2004) não observou sincronia no surgimento de onda folicular, utilizando BE em ovelhas Suffolk. MEIKLE et al. (2001) relataram que o uso de 17β -estradiol não foi eficiente na indução de ovulação.



Figura 7. Frequência de estros identificados por rufião e de ovulações confirmadas por laparoscopia no D7, em ovelhas dos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP), Cipionato de estradiol (CE) e Benzoato de estradiol (BE) - Experimento 1.

Experimento 2

Nas condições avaliadas, não foi possível observar efeito do FSH e do eCG na taxa de manifestação de estro quando o implante de P4 foi mantido por 14 dias fora da estação reprodutiva. Na estação reprodutiva o FSH e o eCG não interferiram na taxa de concepção aos 25 dias.

Os rufiões detectaram o estro em 14,3% (1/7), 85,7% (6/7), 28,6% (2/7) e 14,3% (1/7), nos grupos Controle, eCG, FSH10 e FSH15, respectivamente. A taxa de crescimento folicular do grupo Controle foi inferior ($P \leq 0,05$) a observada no grupo tratado com eCG, no entanto, não houve diferença com relação aos grupos tratados com FSH10 e FSH15 ($P > 0,05$ - Tabela 1). Foram detectadas ovulações somente nos animais do grupo eCG.

Ao prolongar o período com Primer-PR, as taxas de manifestação de estro foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os grupos Controle (57,1% - 4/7), eCG (100% - 6/6), FSH10 (83,8% - 5/6) e FSH15 (50% - 3/6), dando suporte ao uso de apenas uma das doses de FSH (Tabela 2).

Até o momento da inseminação cervical com sêmen fresco (200×10^6 espermatozoides) realizada 54 horas após a retirada do Primer-PR, as taxas de manifestação de estro não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos Controle (64%, 32/50), eCG (87,5%, 42/48) e FSH10 (75,5%, 37/49). As taxas de prenhez diagnosticadas aos 25 dias após a inseminação, não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos Controle (40%, 20/50), eCG (35,4%, 17/48) e FSH10 (42,9%, 21/49) como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 1. Taxa de crescimento folicular, manifestação de estro e ovulação em ovelhas submetidas a protocolo, fora da estação reprodutiva, com uso de Primer-PR por sete dias. Divididos em quatro grupos de sete animais: sem aplicação de gonadotrofina (Controle); ou com aplicação de 400 UI de eCG; 10 mg de FSH e 15 mg de FSH – Experimento 2.

Grupos (n = 7)	Estro (%)
Controle negativo	14,3(1/7) a
eCG	85,7 (6/7) b
FSH (10 mg)	28,6 (2/7) a
FSH (15 mg)	14,3 (1/7) a

Tabela 2. Taxa de manifestação de estro em ovelhas submetidas a protocolo, fora da estação reprodutiva, com uso de Primer-PR por quatorze dias. Divididos em quatro grupos: sem aplicação de gonadotrofina (Controle); aplicação de 400 UI de eCG; 10 mg de FSH e 15 mg de FSH – Experimento 3.

Grupos	Estro (%)
Controle negativo (n = 7)	57,1(4/7)
eCG (n = 6)	100,0 (6/6)
FSH (10 mg - n = 6)	83,8 (5/6)
FSH (15 mg - n = 6)	50,0 (3/6)

Tabela 3. Taxa de prenhez e manifestação de estro em ovelhas submetidas a protocolo, dentro da estação reprodutiva, com uso de Primer-PR por quatorze dias. Divididos em três grupos: Controle (sem gonadotrofinas); eCG (300 UI); e FSH (10 mg) - Experimento 4.

Grupos	Prenhez aos 25 dias (%)	Estro (%)
Controle (n=50)	40,0 (20/50)	64,0 (32/50)
eCG (n=48)	35,4 (17/48)	87,5 (42/48)

FSH (n=49)

42,9 (21/49)

75,5 (37/49)

Experimento 5

No ensaio realizado fora da estação reprodutiva o grupo eCG apresentou em média 4,8 ng/ml de progesterona, diferindo dos grupos BE e GnRH ($p < 0,05$), que não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 8). Os resultados referentes às ovelhas que apresentaram concentração de P4 maior que 1 ng/ml são apresentados na figura 9. No grupo tratado com eCG, a frequência de ovelhas que apresentaram níveis de P4 > 1 ng/ml foi maior do que nos grupos tratados com BE e GnRH ($p < 0,05$). Na figura 10, podemos ver que não houve manifestação de estro no grupo GnRH, ainda que os grupos BE e eCG tenham mostrado taxas de 66% e 50% respectivamente.

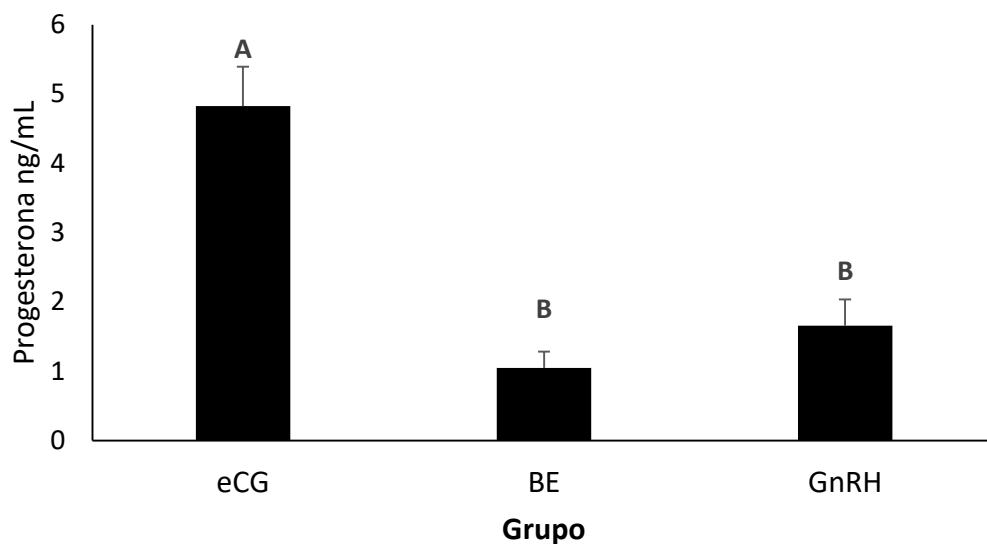


Figura 8. Níveis plasmáticos de P4 em ovelhas sincronizadas com MAP-12 dias e submetidas a tratamento fora da estação reprodutiva: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10) – Experimento 5.

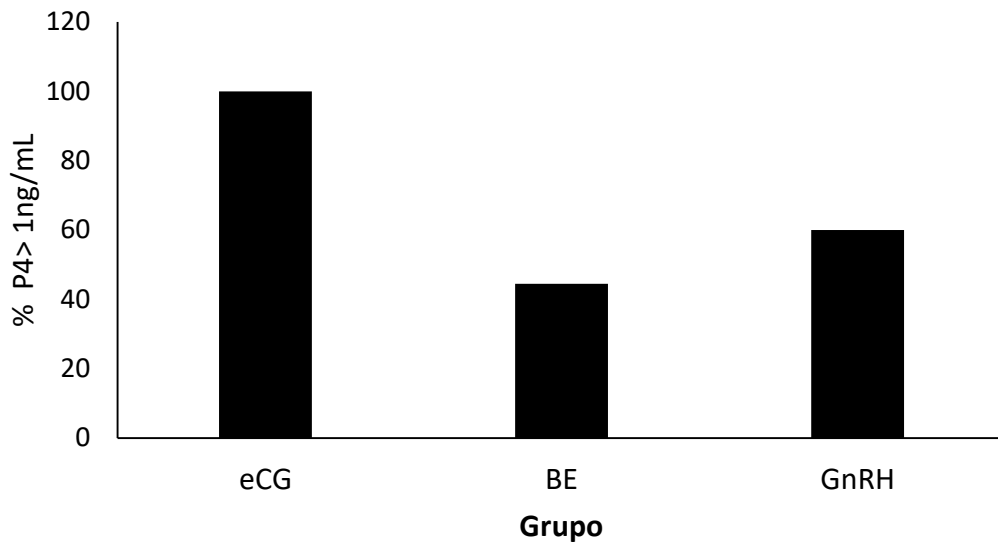


Figura 9. Frequência de ovelhas com níveis de P4 >1ng/ml, sincronizadas com MAP-12 dias e submetidas a tratamento fora da estação reprodutiva: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10) - Experimento 5.

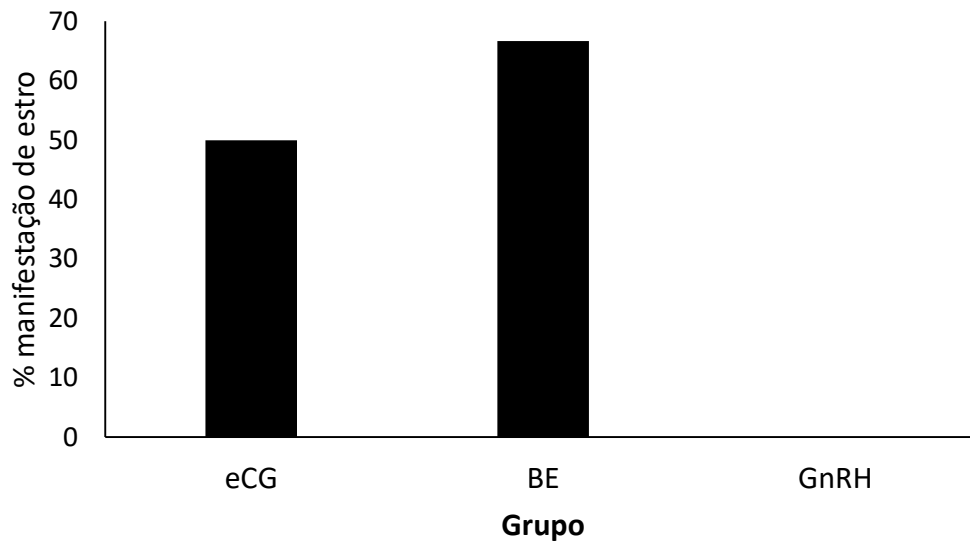


Figura 10. Frequência de estros em ovelhas com níveis de P4 >1ng/ml, sincronizadas com MAP-12 dias e submetidas a tratamento fora da estação reprodutiva: eCG (n=8), BE (n=9) e GnRH (n=10) - Experimento 5.

Conclusão

Houve um incremento no crescimento folicular 24 h após a aplicação de BE, porém, a resposta obtida com a aplicação do CE não foi diferente ao final do período. Novos trabalhos

devem ser conduzidos para determinar a capacidade do CE em induzir a descarga de LH e consolidar a função do BE como indutor de ovulação. O uso de gonadotrofinas aumentou a taxa de crescimento folicular fora da estação reprodutiva, porém, somente o eCG foi capaz de induzir a ovulação. Durante a estação reprodutiva, o uso de gonadotrofinas não aumentou a taxa de prenhez. Fora da estação reprodutiva, o eCG apresentou maior concentração de P4 entre os grupos e o GnRH não foi eficiente em induzir estro.

Referências

BO, G. A., et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, n.8, p.1555-1569. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490821Y>>. Acesso em. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90821-Y](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90821-Y).

COLAZO, M. G., et al. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v.60, n.5, p.855-65. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12935863>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0093-691x(03)00091-8.

DRION, P. V., et al. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, n.3, p.207-15. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592718>>. Acesso em. doi: 10.1051/rnd:2001124.

MAFFILI, V. V., et al. Utilização de gonadotrofina coriônica humana e cipionato de estradiol associado ao dispositivo de liberação controlada de drogas para sincronização de ovulação em cabras da raça Saanen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.210-216. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000200012&lng=en&tlng=en>. Acesso em. doi: 10.1590/S0102-09352005000200012.

MEIKLE, A., et al. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 β . **Animal Reproduction Science**, v.67, n.1-2, p.79-90. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408116>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0378-4320(01)00115-4.

MENCHACA, A.; E. RUBIANES. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, fertility, and development**, v.16, n.4, p.403-13. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15315739>>. Acesso em. doi: 10.10371/RD04037.

MENCHACA, A., et al. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, fertility, and development**, v.22, n.1, p.113-8. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003852>>. Acesso em. doi: 10.1071/RD09222.

SÁ FILHO, M. F., et al. Effect of synthetic progesterone (Afisterone(R)) administration at the moment of CIDR(R) insertion on follicular wave emergence in beef heifers. **International Congress on Animal Reproduction 2004**.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. (Dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004. 152 p.

2.2 Artigo 2 (Short Communication)

Uso do GnRH como indutor de ovulação em protocolos de ressincronização de estro em ovinos

Use of GnRH as an ovulation inducer in estrus resynchronization protocols in ewes

Diego Corrêa Silveira, Rafael Gianella Mondadori, Arnaldo Diniz Vieira, Thomaz
Lucia Junior

Será submetido à revista Ciência Rural

Uso do GnRH como indutor de ovulação em protocolos de ressincronização de estro em
ovinos

Use of GnRH as an ovulation inducer in estrus resynchronization protocols in ewes

SILVEIRA, D.C.^{1,2}, MONDADORI, R.G.¹, VIEIRA, A.D.¹, LUCIA T. Jr.^{1*}

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

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

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

Resumo

A sincronização de estro é uma biotecnologia utilizada para incremento na produtividade, permitindo a realização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), no entanto envolve tratamentos hormonais para garantir a sincronização da ovulação e taxas aceitáveis de prenhez. A utilização de progestágenos e da gonadotrofina coriônica equina (eCG) são empregados para proporcionar o adequado desenvolvimento folicular e ovulação sincronizada. Porém, a característica imunogênica e as crescentes restrições à produção do eCG, geram a necessidade da identificação de outro hormônio para uso na estimulação de crescimento folicular final e da ovulação em ovelhas. Baseado na hipótese da realização de uma segunda IATF no momento que corresponderia ao retorno natural ao estro, testou-se um análogo sintético do GnRH, como indutor de ovulação em protocolo de ressincronização, determinando as taxas de manifestação de estro e prenhez. Inicialmente todas as ovelhas (n=115) tiveram o estro sincronizado através esponjas impregnadas com MAP, no momento da retirada os animais receberam 300UI de eCG e realizada a IATF1 48 horas após a remoção. Os animais foram divididos em dois grupos, controle (n=59) e GnRH (n=56). A aplicação de GnRH como indutor de ovulação não mostrou efeito benéfico sobre a manifestação de estro em protocolo de ressincronização em ovelhas.

Palavras-chave: eCG; GnRH; IATF; ovelhas; ressincronização de estro;

Abstract

Estrus synchronization is a biotechnology used to increase productivity, allowing artificial insemination at a fixed time (FTAI), however it involves hormonal treatments to ensure synchronization of ovulation and acceptable pregnancy rates. The use of progestins and equine chorionic gonadotropin (eCG) are used to provide adequate follicular development and synchronized ovulation. However, the immunogenic characteristic and the increasing restrictions on the production of eCG, generate the need for the identification of another hormone for use in stimulating final follicular growth and ovulation in sheep. Based on the hypothesis of a second FTAI at the moment that would correspond to the natural return to estrus, a synthetic analog of GnRH was tested as ovulation inducer in a resynchronization protocol, determining the rates of estrus and pregnancy manifestation. Initially all sheep (n = 115) had estrus synchronized through sponges impregnated with MAP, at the time of removal the animals received 300UI of eCG and IATF1 was performed 48 hours after removal. The animals were divided into two control groups (n = 59) and GnRH (n = 56). The application of GnRH as an ovulation inducer did not show a beneficial effect on ovulation in a sheep resynchronization protocol.

Keywords: eCG; GnRH; FTAI; ewes; estrus resynchronization;

Introdução

A sincronização de estro é uma biotécnica utilizada para incremento na produtividade, permitindo a realização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sem a necessidade de observação de estro. Progestágenos e a gonadotrofina coriônica equina (eCG) são empregados para proporcionar o adequado desenvolvimento folicular e uma ovulação sincronizada. Porém, existe uma pressão crescente da opinião pública para reduzir a produção de eCG, o que pode determinar a redução na oferta do produto e um aumento significativo no seu custo. Desta forma, é necessário determinar protocolos que possam reduzir ou até dispensar o uso do eCG em programas de sincronização e ressincronização de estro para IATF, melhorando as taxas de serviço e reduzindo o intervalo entre inseminações, sem comprometer a sobrevivência do embrião. Uma importante redução no uso de eCG seria obtida com a realização de uma segunda IATF no momento que corresponderia ao retorno natural ao estro, mesmo em fêmeas que estejam gestantes após a primeira IATF. Estudos anteriores demonstraram que é possível ressincronizar o retorno do estro em vacas não gestantes após a primeira IA em bovinos de corte e leite *B. taurus* (GALVÃO et al., 2007). Estas estratégias são eficazes na redução do intervalo entre a primeira e a segunda inseminações. Em ovinos, protocolos para ressincronizar a

ovulação foram aplicados em ovelhas inseminadas anteriormente, sem saber quais estavam prenhes (MIRANDA et al., 2018).

Contudo, apesar de fêmeas não gestantes manifestarem o estro de forma concentrada, a falta do eCG pode determinar uma dispersão do momento da ovulação, afetando a taxa de prenhez da segunda IATF. Como alternativa ao eCG, em ovinos, testou-se o estradiol, para induzir a onda folicular (BARRETT et al., 2008) e análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), como indutor da ovulação (RUBIANES et al., 1997), de modo a favorecer o sucesso na fecundação na segunda IATF. Tratamentos com GnRH, quando a prenhez ainda era indeterminada, não apresentaram prejuízo sobre a taxa de prenhez da IA anterior em vacas leiteiras (CHEBEL et al., 2003).

Portanto, o presente estudo avaliou o uso do GnRH como indutor de novas ondas foliculares com o status de prenhez desconhecido e determinar as taxas de manifestação de estro e de prenhez em ovelhas que retornaram ou não ao estro após a realização de uma primeira IATF, como alternativa ao uso de eCG, visando diminuir os custos da ressincronização.

Material e Métodos

Os procedimentos aplicados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Processo - 73402 CEEA-UFPEL). Os estudos foram realizados durante a estação reprodutiva (março e abril de 2019), em duas propriedades. Uma propriedade é localizada no município de Capão do Leão (latitude 31°45'48" sul e longitude 52°29'02" oeste), incluindo 58 ovelhas cruzadas. A outra propriedade é localizada em Jaguarão (latitude -32°33'58" sul e longitude 53°22'33" oeste), com 57 fêmeas da raça Corriedale. No total, os experimentos incluíram 115 ovelhas não lactantes, múltiparas, consideradas aptas à reprodução após avaliação ginecológica e com escore corporal de 2,5, mantidas em sistema extensivo de criação, em campo nativo e com água *ad libitum*.

Inicialmente, todas as ovelhas tiveram o estro sincronizado através da inserção de esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (D-14) mantidas por 12 dias. No momento da retirada das esponjas (D-2), as ovelhas receberam 300 UI de eCG (Novormon®, Intervet Schering-Plough do Brasil S. A.), por via intramuscular (IM). A primeira IATF (IATF1) foi realizada 48 horas após a remoção das esponjas (D0), através do método cervical superficial. O sêmen utilizado foi coletado de carneiros previamente avaliados como aptos a reprodução, com o auxílio de vagina artificial. Após a avaliação da motilidade e do vigor, os ejaculados foram agrupados, formando um *pool*, que foi diluído em meio Tris-gema (HAHN, 1972) e mantido a temperatura ambiente. A dose inseminante (200×10^6

espermatozoides móveis em um volume de 100 µl) foi depositada na entrada da cérvix com o auxílio de espécuro e pistola micropipetadora (Walmur®). Ao final do protocolo, a detecção do estro foi feita por rufiões. Foram utilizados machos castrados tratados com cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis; DE SOUZA et al. (2005), pintados com uma mistura de óleo de soja e pigmento em pó na região esternal.

Visando testar a hipótese da possibilidade de realizar uma nova IATF sem diagnóstico de gestação após a IATF1, em ovelhas que retornariam ao estro após o estímulo do tratamento inicial, os rufiões foram reintroduzidos no rebanho no D15. A segunda IATF (IATF2) foi realizada nos dias 16 e 17, quando ocorreu a maior frequência de estros, independentemente do status gestacional das ovelhas. Para esse procedimento, em cada propriedade, as ovelhas foram divididas de forma aleatória em dois grupos homogêneos, contendo ovelhas que não manifestaram estro (possivelmente prenhes da IATF1) e ovelhas em estro. A IATF2 foi conduzida da mesma forma descrita para a IATF1. Conforme mostrado na Figura 1, a IATF2 foi realizada sem tratamento adicional (controle, n = 59), ou com aplicação de 4 µg de acetato de busserelina (Sincroforte®, Ouro Fino; n = 56), como indutor da ovulação.

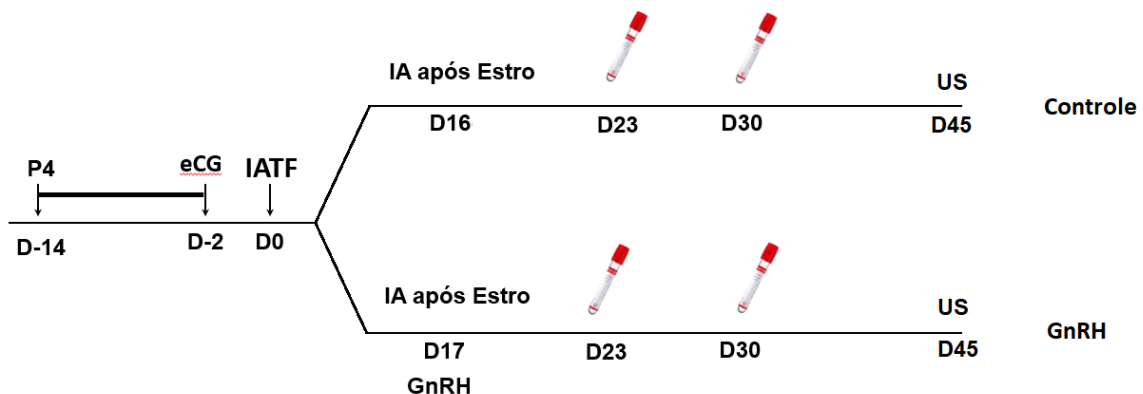


Figura 1. Organograma dos procedimentos realizados para primeira e segunda inseminação em tempo fixo (IATF), com ou sem aplicação de GnRH.

Em uma das propriedades, no D31 os rufiões foram novamente introduzidos no rebanho para verificar a distribuição de retorno ao estro nas fêmeas não gestantes. O diagnóstico de gestação foi realizado no D45 por ultrassonografia transretal, com transdutor linear do equipamento A5Vet (Sonoscape®). Também foram realizadas coletas de sangue para a mensuração da concentração sérica de progesterona, através de venopunção da jugular, em tubos à vácuo. Após centrifugação, o soro foi aspirado e estocado em microtubos de 2,0 mL e armazenado a -20°C, para posterior análise.

As frequências foram comparadas entre tratamentos pelo teste de qui-quadrado.

Resultados e Discussão

A aplicação de 4 µg de acetato de busserelina não foi eficiente em induzir o estro no protocolo de ressincronização em ovelhas. Após a IATF1, aproximadamente 58% das ovelhas submetidas ao protocolo utilizando MAP e 300 UI de eCG manifestaram estro, de forma semelhante ao relatado por MIRANDA et al. (2018), enquanto 63% das ovelhas submetidas à IATF2 apresentaram estro, sendo que o grupo GnRH não diferiu do controle ($P > 0,05$). Assim, o protocolo de IATF1, utilizado quando as ovelhas ainda não estavam divididas em dois grupos apresentou menor frequência de ovelhas em estro comparado à IATF2, na qual foi utilizado GnRH. Este resultado contradiz os relatos de LUTHER et al. (2007), com 76% das ovelhas demonstrando estro após tratamento com GnRH. Nos resultados da IATF2, foram subtraídas as ovelhas diagnosticadas como gestantes após a IATF1.

Ainda que a taxa de manifestação de estro obtida com o tratamento de sincronização tenha sido adequada, a taxa de prenhez obtida com a IATF1 foi inferior ao esperado (Figura 2), especialmente se considerados os resultados de (OLIVERA-MUZANTE et al., 2011), com taxa de prenhez de 48%. Sabe-se que o tratamento com GnRH induz um aumento na secreção do hormônio luteinizante (LH) 1-4 horas após a sua administração, com posterior ocorrência da ovulação (CAVALCANTI et al., 2012) e formação do corpo lúteo. No grupo tratado com análogo de GnRH era esperada uma concentração das ovulações, devido a antecipação da ovulação nas ovelhas com manifestação tardia de estro. Porém, a reduzida manifestação de estro após tratamento com GnRH provavelmente se deve à antecipação do pico do LH, o que não permitiu que o folículo dominante presente no ovário produzisse E2 em níveis suficientes para induzir o aparecimento do estro (HAY & MOOR, 1975). Portanto, com a injeção de GnRH houve bloqueio da esteroidogênese ovariana, reduzindo rapidamente a concentração de E2, impedindo a ocorrência de estro. Portanto, o tratamento com GnRH foi ineficiente em sincronizar o estro, resultando em reduzida taxa de prenhez após a IATF2 (Figura 2).

A distribuição de cios ocorreu em um padrão esperado, com picos de manifestação de estro aproximadamente a cada 17 dias (LOBATO et al., 2013), como pode ser observado nas Figuras 3 e 4. A hipótese de que a eficiência reprodutiva pode ser melhorada com o uso de um análogo da GnRH no momento do retorno da IATF1 foi rejeitada, pois a aplicação de GnRH não exerceu efeito sobre as taxas de concepção ($P > 0,05$).

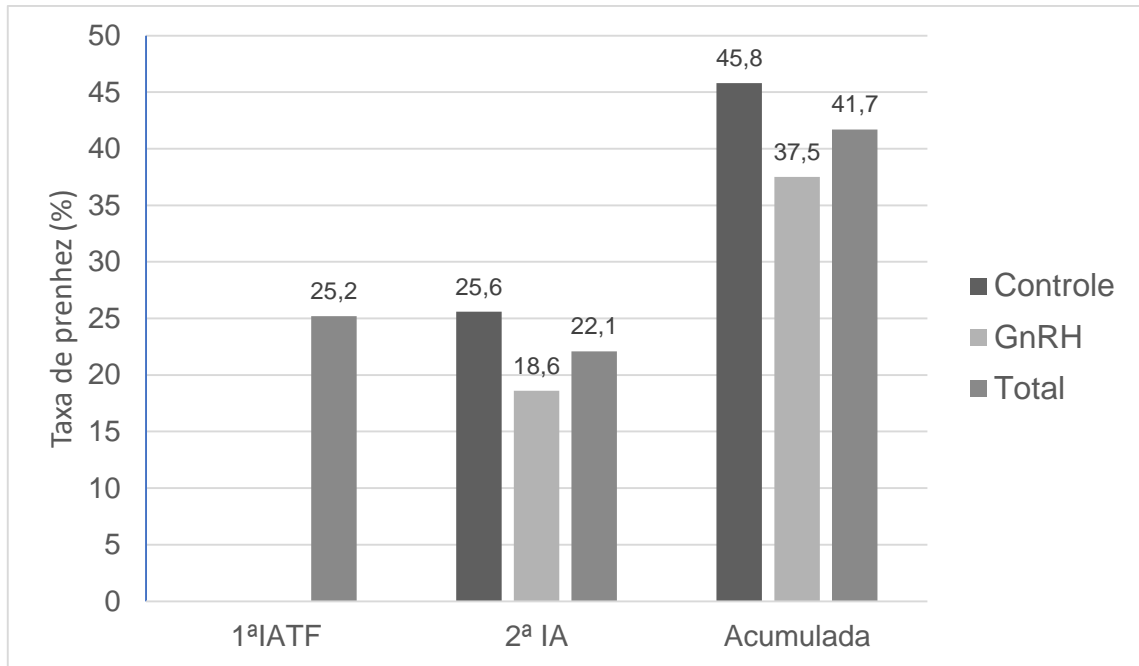


Figura 2. Taxa de prenhez após duas inseminações artificiais em tempo fixo, com ou sem administração de um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).

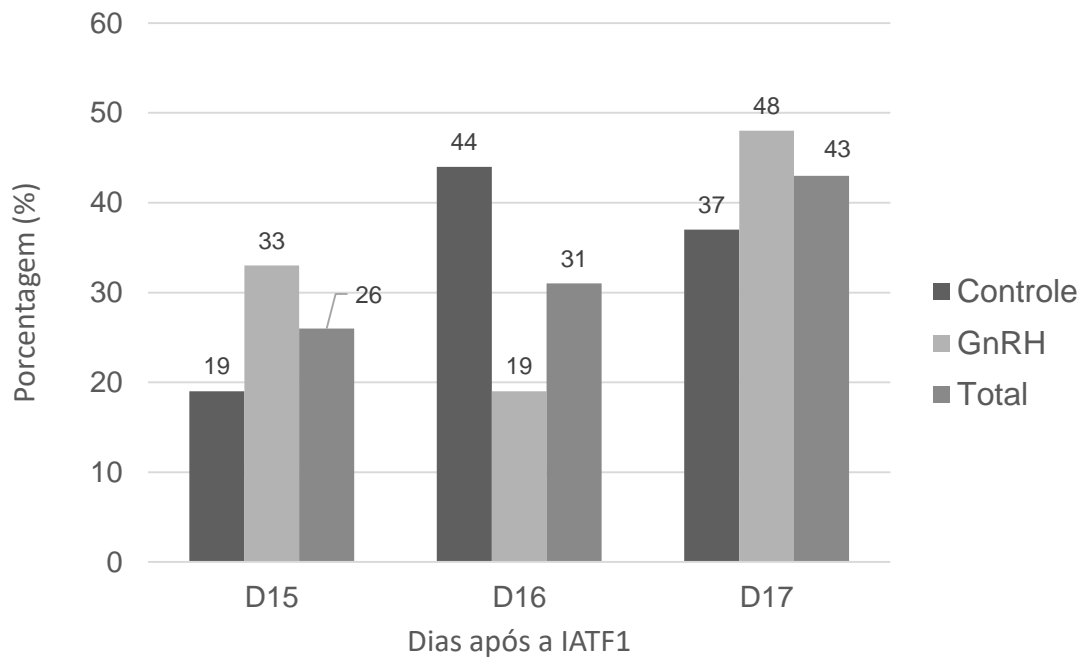


Figura 3. Distribuição de retornos ao estro após a realização da primeira inseminação artificial em tempo fixo (IATF1).

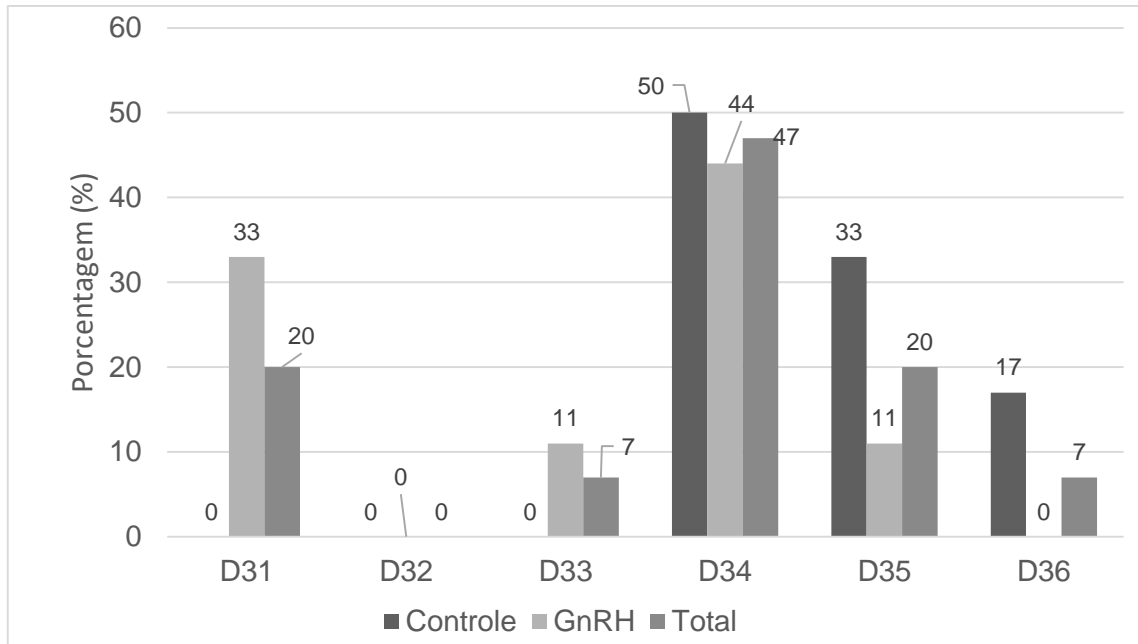


Figura 4. Distribuição de retornos ao estro após a realização da segunda inseminação artificial em tempo fixo (IATF2), com ou sem administração de um análogo de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).

Conclusão

O uso de um análogo do GnRH como indutor de ovulação não mostrou efeito benéfico sobre a sincronização do estro em ovelhas após uma inseminação artificial em tempo fixo (IATF), ainda que tenha ocorrido um leve incremento na taxa de prenhez após uma segunda IATF. Ovelhas submetidas a sincronização de estro e IATF na estação reprodutiva podem receber uma segunda IATF 17 dias após a primeira IATF, permitindo um aumento na taxa de prenhez acumulada, sem a necessidade de um novo tratamento com eCG.

Referências

BARRETT, D. M., et al. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.827-36. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258293>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.12.010.

CAVALCANTI, A. D. S., et al. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.1412-1418. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982012000600014&nrm=iso>. Acesso em. doi.

CHEBEL, R. C., et al. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1389-99. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519461>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0093-691x(03)00117-1.

DE SOUZA, C. J. H., et al. Alternativa hormonal para o preparo de rufiões ovinos. **Embrapa Pecuária Sul-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**. 2005. Disponível em: em. doi.

GALVÃO, K. N., et al. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.9, p.4240-52. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699043>>. Acesso em. doi: 10.3168/jds.2007-0094.

HAHN, R. A contribution to the deep-freezing-preservation of goatbuck-and ram-semen. **World Review Animal Production**, v.8, n.3, p.80. 1972. Disponível em: em. doi.

HAY, M. F.; R. M. MOOR. Functional and structural relationships in the Graafian follicle population of the sheep ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v.45, n.3, p.583-93. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1107536>>. Acesso em. doi: 10.1530/jrf.0.0450583.

LOBATO, E., et al. Fisiologia reprodutiva de ovinos. **PUBVET**, v.7, p.1568-1574. 2013. Disponível em: em. doi.

LUTHER, J., et al. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. **Small Ruminant Research**, v.72, n.2-3, p.227-231. 2007. Disponível em: em. doi.

MIRANDA, V. O., et al. Estrus resynchronization in ewes with unknown pregnancy status. **Theriogenology**, v.106, p.103-107. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049921>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.019.

OLIVERA-MUZANTE, J., et al. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v.75, n.7, p.1232-8. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247622>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.036.

RUBIANES, E., et al. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF 2alpha and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.48, n.7, p.1093-104. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728198>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0093-691x(97)00342-7.

4 Considerações Finais

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) representa uma ferramenta prática em programas genéticos que permitem concentrar o período de serviço e elimina a necessidade de detecção de estro. Aumentando a eficiência geral de programas de melhoramento genético e o uso de machos superiores. Os tratamentos tradicionais para sincronização da ovulação em ovelhas consistem em esponjas intravaginais contendo progesterona por 12 a 14 dias junto com a gonadotrofina coriônica equina (eCG) que é amplamente utilizada em protocolos de IATF para sincronizar e induzir o crescimento folicular final e ovulação.

Protocolos para ressincronizar a ovulação foram utilizados a todas as ovelhas anteriormente inseminadas sem saber quais estavam prenhes. No entanto, administrar esses tratamentos para todo o rebanho é caro, demorado e trabalhoso e aumenta o uso de hormônios desnecessários nas ovelhas que conceberam da inseminação anterior. No entanto, envolve tratamentos hormonais para garantir a sincronização da ovulação e taxas aceitáveis de prenhez. Atualmente, a aplicação destas biotecnologias em condições comerciais requer procedimentos de fácil implementação e taxas reprodutivas aceitáveis.

Embora diversas alternativas de protocolos hormonais tenham surgido, os índices reprodutivos, continuam instáveis e com resultados pouco satisfatórios, principalmente quando utilizada a inseminação artificial em comparação à monta natural. Em bovinos, o estradiol aplicado concomitantemente com a inserção de dispositivos liberadores de progesterona induz atresia folicular e o surgimento de nova onda folicular após quatro dias e meio. No entanto, na ausência de progesterona, o estradiol resulta em ovulação do folículo dominante em bovinos. Em ovinos, o estradiol foi testado apenas para induzir a onda folicular, que começa aproximadamente 4-6 dias após a aplicação do hormônio.

Neste estudo podemos verificar que ovelhas submetidas a sincronização de estro e IATF podem receber uma segunda inseminação cervical superficial 17 dias após a primeira, permitindo um aumento na taxa de prenhez sem novo tratamento com eCG. Assim diminuiria os custos de uma ressincronização e dispensaria a utilização de hormônios como eCG, evitando uma resposta imune. O uso de um análogo do GnRH não mostrou efeito benéfico sobre a sincronização do estro em ovelhas, fazendo com que ocorresse uma dispersão de ovulação, podendo causar redução nas taxas de prenhez e inviabilizando o uso de ressincronização no manejo reprodutivo das fêmeas.

Pelos estudos realizados, não foi possível determinar a capacidade do CE em induzir a descarga de LH e consolidar a função do BE como indutor de ovulação, apesar de haver tido um incremento no crescimento folicular 24 h após a aplicação de BE. Foi observado também que o uso de gonadotrofinas aumentou a taxa de crescimento folicular fora da estação, porém, somente o eCG foi capaz de induzir a ovulação. Durante a estação reprodutiva, o uso de gonadotrofinas não aumentou a taxa de prenhez. Na contra estação o grupo eCG apresentou maior concentração de P4 entre os grupos, e o grupo GnRH não foi eficiente em induzir estro.

Referências

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZALEZ-BULNES, A. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.27, n.1, p.67-79, 2011.

ASSUNÇÃO, C. F. D. **Indução e sincronização de estro em ovinos: revisão de literatura**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; MANN, G. E.; MCNEILLY, A. S. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.43, p.125-138, 1991.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, n.3, p.220-262, 2000.

BARRETT, D. M.; BARTLEWSKI, P. M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; HUCHKOWSKY, S. L.; EPP, T.; RAWLINGS, N. C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.827-836, 2008.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, n.8, p.1555-1569, 1994.

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.

CASTILHO, C.; GAMBINI, A. L.; FERNANDES, P.; TRINCA, L. A.; TEIXEIRA, A. B.; BARROS, C. M. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F2alpha and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.1, p.91-101, 2000.

CAVALCANTI, A. D. S.; BRANDÃO, F. Z.; NOGUEIRA, L. A. G.; FONSECA, J. F. D. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.1412-1418, 2012.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E.; CERRI, R. L.; GALVAO, K. N.; JUCHEM, S. O.; THATCHER, W. W. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1389-1399, 2003.

CLINE, M. A.; RALSTON, J. N.; SEALS, R. C.; LEWIS, G. S. Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or P.G. 600 to estrus and ovulation in ewes. **Journal of animal science**, v.79, n.3, p.589-594, 2001.

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

COSTA, R. G.; SANTOS, N. M. D.; SOUSA, W. H. D.; QUEIROGA, R. D. C. R. D. E.; AZEVEDO, P. S. D.; CARTAXO, F. Q. Qualidade física e sensorial da carne de cordeiros de três genótipos alimentados com rações formuladas com duas relações volumoso: concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.8, p.1781-1787, 2011.

DRION, P. V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J. Y.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J. F. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, n.3, p.207-215, 2001.

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

FAO. Estatísticas FAO - FAOSTAT. **The Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

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

GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E.; CERRI, R. L.; CHEBEL, R. C.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G.; BICALHO, R. C. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.9, p.4240-4252, 2007.

HAHN, R. A contribution to the deep-freezing-preservation of goatbuck-and ram-semen. **World Review Animal Production**, v.8, n.3, p.80, 1972.

HAY, M. F.; MOOR, R. M. Functional and structural relationships in the Graafian follicle population of the sheep ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v.45, n.3, p.583-593, 1975.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

LOBATO, E.; DA COSTA FERRO, R. A.; DOS SANTOS, K. J. G.; DA COSTA, M. A.; DA COSTA FERRO, D. A.; DO PALES SANTOS, A. P. Fisiologia reprodutiva de ovinos. **PUBVET**, v.7, p.1568-1574, 2013.

LUTHER, J.; GRAZUL-BILSKA, A.; KIRSCH, J.; WEIGL, R.; KRAFT, K.; NAVANUKRAW, C.; PANT, D.; REYNOLDS, L.; REDMER, D. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. **Small Ruminant Research**, v.72, n.2-3, p.227-231, 2007.

MAFFILI, V. V.; TORRES, C. A. A.; PONTES, R. A. M.; GUIMARÃES, J. D.; PROSPERI, C. P. Utilização de gonadotrofina coriônica humana e cipionato de estradiol associado ao dispositivo de liberação controlada de drogas para sincronização de ovulação em cabras da raça Saanen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.210-216, 2005.

MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; GAROFALO, E. G.; CARLSSON, M. A.; LUNDEHEIM, N.; RUBIANES, E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17beta. **Animal Reproduction Science**, v.67, n.1-2, p.79-90, 2001.

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

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, fertility, and development**, v.22, n.1, p.113-118, 2010.

MIRANDA, V. O.; OLIVEIRA, F. C.; DIAS, J. H.; VARGAS JUNIOR, S. F.; GOULARTE, K. L.; SA FILHO, M. F.; SA FILHO, O. G.; BALDASSARRE, H.; VIEIRA, A. D.; LUCIA, T., JR.; GASPERIN, B. G. Estrus resynchronization in ewes with unknown pregnancy status. **Theriogenology**, v.106, p.103-107, 2018.

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

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

RAWLINGS, N. C.; JEFFCOATE, I. A.; RIEGER, D. L. The influence of estradiol-17beta and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v.22, n.5, p.473-488, 1984.

REYNA, J.; THOMSON, P. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. Synchrony of ovulation and follicular dynamics in merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction in domestic animals**, v.42, n.4, p.410-417, 2007.

ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; POBEL, T.; DELETANG, 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. **Biology of reproduction**, v.61, n.1, p.209-218, 1999a.

ROY, F.; MAUREL, M. C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. **Biology of reproduction**, v.60, n.4, p.805-813, 1999b.

RUBIANES, E.; BEARD, A.; DIERSCHKE, D. J.; BARTLEWSKI, P.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF

2alpha and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.48, n.7, p.1093-1104, 1997.

RUBIANES, E.; CASTRO, T. D.; KMAID, S. Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.356, 1998.

SÁ FILHO, M. F.; AMARAL, J. P. B.; MANTOVANI, A. P.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Effect of synthetic progesterone (Afisterone(R)) administration at the moment of CIDR(R) insertion on follicular wave emergence in beef heifers. *In*: International Congress on Animal Reproduction, 2004, **Anais do International Congress on Animal Reproduction**. 2004.

SOUZA, C.; JAUME, C.; CARLOS, J.; MORAES, J. Alternativa hormonal para o preparo de rufiões ovinos. **Embrapa Pecuária Sul**, Bagé, 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/CT56_2006_000g0fj46m002wx5ok026zxpgrpjni9g.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2020.

SOUZA, J. D. F. D.; GUIMARÃES, V. P.; MAGALHÃES, M. K. A.; MALHADO, M. C.; BARBOSA, P.; MARTINS, E. C.; HOLANDA FILHO, M. Z. F.; MENDES, E. M. E. P. Embrapa Caprinos e Ovinos. **CNA Brasil**, 2016. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/arquivos/materias/%7B671913533-104D%7D_Ativo_Ovinos_Caprinis.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2020.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S. M.; BARTOLOME, J. A.; SANTOS, J. E. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. **Domestic animal endocrinology**, v.23, n.1-2, p.243-254, 2002.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.55, n.4, p.993-1004, 2001.