

KARIN BONATTO XAVIER DA SILVEIRA

**SUPEROVULAÇÃO COM FSH OU PMSG PARA  
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVELHAS SUFFOLK  
DURANTE O ANESTRO SAZONAL**

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Veterinárias,  
Área de Patologia Veterinária, junto à  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz E. Kozicki

CURITIBA

2000



## PARECER

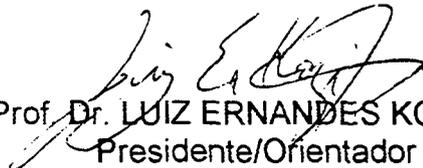
A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **KARIN BONATTO XAVIER DA SILVEIRA** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

1) A Tese, intitulada **“SUPEROVULAÇÃO COM FSH OU PMSG PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVELHAS SUFFOLK DURANTE O ANESTRO SAZONAL”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.

2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito “A” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 21 de junho de 2000.

  
Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI  
Presidente/Orientador

  
Prof. Dr. ALMIR ANTONIO URBANETZ  
Membro

  
Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS  
Membro

## **Agradecimentos**

À todos aqueles que me auxiliaram de forma direta e indireta na realização deste trabalho.

E principalmente:

Aos meus pais, Romilto e Tereza, por tudo que sou.

Ao meu marido, Antonio Sergio, por todo amor, carinho e compreensão.

Aos meus amigos Capovilla, Rigolon e Maritza pela ajuda e auxílio técnico na execução da parte prática deste trabalho.

Ao professor Nelson Haj Mussi Jr. pelo auxílio nos cálculos estatísticos.

Ao professor Kozicki , pela orientação na correção da redação e execução desta dissertação.

À Fazenda Experimental do Canguiri e seus funcionários.

Aos laboratórios Intervet e Calier do Brasil pelo fornecimento dos homônios.

Ao laboratório de medicina nuclear do Hospital de Clínicas pela análise dos níveis de progesterona.

***“O mundo está nas mãos daqueles  
que têm coragem de sonhar, e correr  
o risco de viver seus sonhos “***

***(Paulo Coelho)***

## Sumário

Lista de Figuras .....	VII
Lista de Tabelas .....	VII
Lista de Abreviaturas .....	VIII
Resumo .....	IX
Abstract .....	X
1. Introdução .....	1
2. Literatura .....	3
2.1. Ciclo estral .....	3
2.2. Anestro sazonal .....	7
2.3. Sincronização do cio .....	10
2.4. Superovulação .....	13
2.5. Fertilização .....	17
2.6. Colheita de embriões .....	18
2.7. Qualidade dos embriões .....	21
2.8. Importância da Transferência de embriões .....	25
3. Material e método .....	26
3.1. Local, período e animais utilizados .....	26
3.2. Sincronização do cio .....	26
3.3. Tratamento superovulatório .....	27

3.4. Coleta de embriões .....	27
3.5. Determinação dos níveis de progesterona .....	28
3.6. Análise estatística .....	29
4. Resultados .....	30
5. Discussão .....	34
6. Conclusão .....	41
7. Referências bibliográficas .....	42

## Lista de Figuras:

- FIGURA 1 – Ondas de FSH e LH no crescimento final dos folículos destinados a ovular ..... **pag. 5**
- FIGURA 2 – Estágios de desenvolvimento do embrião. O código para estágio de desenvolvimento é numérico. O número 1 identifica um oócito não fecundado ou embrião de uma célula. O número 2 identifica embriões com 2 a 16 células. O número 3 identifica uma mórula inicial e os números 4 a 9 identificam embriões nos estágios pós compactação, conforme ilustrado acima. Na transferência comercial de embriões, os mesmos são colhidos nos dias 5 a 7 do ciclo estral de ovinos (mórula a blastocisto) ..... **pag. 23**
- FIGURA 3 – Número de corpos lúteos (CL) observados em cada ovelhas nos tratamentos com FSH e PMSG ..... **pag. 32**
- FIGURA 4 - Número de embriões colhidos de cada ovelhas nos tratamentos com FSH e PMSG ..... **pag. 32**
- FIGURA 5 - Número de embriões viáveis colhidos de cada ovelhas nos tratamentos com FSH e PMSG ..... **pag. 33**
- FIGURA 6 – Comparação do nível de progesterona plasmática ( $P_4$ ) no dia da coleta com o número de ovulações (CL) em ovelhas Suffolk superovuladas com FSH ..... **pag. 33**
- FIGURA 7 – Comparação do nível de progesterona plasmática ( $P_4$ ) no dia da coleta com o número de ovulações (CL) em ovelhas Suffolk superovuladas com PMSG ..... **pag. 33**

## Lista de Tabelas

- TABELA 1 - Percentagem de ovelhas em relação à produção de CL e médias de CL por ovelhas Suffolk superovuladas com FSH e PMSG fora da estação reprodutiva – Pinhais (Pr) - novembro 1998 ..... **pag. 30**
- TABELA 2 – Percentagens de recuperação, fertilização de óvulos e de ovelhas que produziram embriões viáveis quando tratadas com FSH ou PMSG fora da estação reprodutiva (n=7) – Pinhais (Pr) – novembro 1998 .. **pag. 30**
- TABELA 3 - Número de embriões colhidos, viáveis e percentagem de embriões viáveis pelo número de embriões colhidos em ovelhas Suffolk tratadas com FSH e PMSG fora da estação reprodutiva – Pinhais (Pr) - novembro 1998..... **pag. 31**

TABELA 4 – Médias e percentagem dos embriões colhidos quanto ao grau de desenvolvimento em ovelhas Suffolk tratadas com FSH e PMSG fora da estação reprodutiva – Pinhais (Pr) – novembro 1998 ..... pag. 31

TABELA 5 - Níveis de  $p_4$  plasmática (ng/ml) em doadoras ovinas da raça Suffolk mensurados antes (dia 0), durante o período de permanência do implante de progesterona (dia 10) e no dia da coleta de embriões (dia 19) – pinhais (pr) – novembro 1998..... pag. 32

## Lista de Abreviaturas

FGA	-	Fluorogestona
FSH	-	Hormônio folículo estimulante ("Follicle stimulating hormone")
GnRH	-	Hormônio liberador de gonadotrofina ("Gonadotrophin release hormone")
LH	-	Hormônio luteinizante
MAP	-	Acetato de medroxiprogesterona
$P_4$	-	Progesterona
$PGF_{2\alpha}$	-	Prostaglandina $F_{2\alpha}$
PMSG	-	Gonadotrofina sérica de égua prenhe ("Pregnant mare serum gonadotrophin")
PRL	-	Prolactina
TE	-	Transferência de embriões

## Resumo

O uso de progestágenos e a estimulação da ovulação com gonadotrofinas permite a superovulação de ovelhas durante o anestro sazonal e a sincronização de seus ciclos.

A resposta aos tratamentos superovulatórios foi determinada com o uso de hormônio folículo estimulante (FSH) e gonadotrofina do soro de égua prenhe (PMSG) no anestro sazonal em ovelhas Suffolk. As ovelhas (n=15) previamente sincronizadas com implantes subcutâneos (Norgestomet) foram divididas em dois grupos experimentais, que receberam 250 UI de FSH e 1000 UI de PMSG, respectivamente. Todas as ovelhas foram submetidas à monta natural. A coleta de embriões foi realizada no dia 7 após a retirada do implante. A média do número de corpos lúteos (taxa de ovulação), o número total de embriões e o número de embriões viáveis colhidos foram maiores ( $P < 0,05$ ) para o tratamento com FSH do que para o tratamento com PMSG. Amostras de sangue foram colhidas durante o tratamento e no dia da coleta de embriões para estudar a taxa de progesterona. Os níveis de progesterona não diferiram entre os tratamentos.

O uso de FSH aumentou a resposta superovulatória e mostrou ser melhor do que o PMSG no anestro sazonal.

## Abstract

The use of progestagens and the stimulating of ovulation with gonadotrophins has permitted the superovulation of ewes during the seasonal anestrus and synchronization of their cycles.

The response of superovulatory treatment with follicle stimulating hormone (FSH) and pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) in seasonally anestrus Suffolk sheep was determined. The ewes (n=15) previously synchronized with subcutaneous implants (Norgestomet) were divided into 2 experimental groups, that received injections of 250 UI of FSH and 1000 UI of PMSG, respectively. All ewes were naturally mated. The embryo collection was realized on day 7 after the removal of the implants. The mean number of *corpora lutea* (ovulation rate), the total number of embryos and the number of normal embryos recovered were higher ( $P < 0,05$ ) in FSH than PMSG treatment. Blood samples were collected during the treatment and at embryo collection day to study progesterone rate. The progesterone levels did not differ between treatments.

The use of FSH improved the superovulatory response and showed to be better than PMSG in seasonal anestrus.

## 1. Introdução:

As pesquisas na área de transferência de embriões (TE) vêm sendo realizadas de forma rotineira desde 1955 (WILMUT, 1994). Durante esse tempo, os métodos têm sido melhorados consideravelmente. Foram desenvolvidas uma série de técnicas para a manipulação e conservação dos embriões, além da pesquisa de adequados protocolos de sincronização de estro e de superovulação (RODRIGUES, 1996).

A aplicação comercial da transferência de embriões em ovinos está limitada por diversos fatores, como por exemplo: custo elevado da utilização da técnica; baixos índices de resposta à superovulação e de produção de cordeiros em relação ao número de embriões colhidos; proibições governamentais quanto à importação e exportação de embriões; resistência da indústria ovina e o baixo valor individual do ovino (NEVES, 1989). Contrastando a tudo isso, estas biotecnologias vêm sendo utilizada de forma crescente e com sucesso nos centros criatórios de maior expressão, como os existentes na Nova Zelândia e Austrália.

A grande variabilidade da resposta superovulatória ainda é um dos maiores entraves ao sucesso dos programas de transferência de embriões, onde menos de 40% das causas têm sido explicadas (HAHN, 1992). Raças ovinas, dose de hormônio e estação do ano são algumas variáveis reconhecidas como causadoras dos diferentes resultados da superovulação.

Os dois tratamentos superovulatórios mais comumente utilizados aplicam a gonadotrofina sérica de égua prenhe (PMSG) e o hormônio folículo estimulante (FSH – extrato pituitário cru ou solúvel de equinos, suínos e ovinos) no final da fase lútea em

combinação com progestágenos ou prostaglandinas. A PMSG tem maior disponibilidade no mercado, facilidade de administração e preço mais acessível, no entanto, têm-se observado falhas na ovulação ou baixas respostas ovulatórias. O FSH tem apresentado respostas mais eficientes devido à sua ação mais específica, embora necessite ser administrado várias vezes.

Escassas informações são encontradas a respeito da resposta superovulatória em ovinos Suffolk no Brasil. Essa raça de origem inglesa, se destaca pela sua elevada capacidade produtora de carne de boa qualidade, adaptou-se bem no país, apresentando excelente fertilidade e cordeiros com boa velocidade de crescimento. A raça apresenta maturidade precoce (primeiro estro aos 8 meses de idade), alta incidência de gêmeos e período de anestro na primavera.

Em função de todos esses aspectos, este estudo tem o objetivo de comparar os tratamentos superovulatórios com PMSG e FSH, avaliando-se parâmetros qualitativos e quantitativos da resposta ovariana e produção de embriões fora da estação reprodutiva em ovelhas Suffolk.

## 2. Literatura:

### 2.1. Ciclo Estral

O ciclo estral nos ovinos é regulado por fatores como meio ambiente, genéticos, fisiológicos, hormonais, comportamentais e psicológicos.

A duração do ciclo estral na ovelha é de 16 a 17 dias e a ovulação ocorre 24 a 30 horas após o início do cio. A duração do estro e o momento da ovulação variam em relação aos fatores internos e externos. O intervalo entre o início do estro e a onda ovulatória de hormônio luteinizante (LH) se prolonga à medida que aumenta o número de ovulações (DE THIMONIER e PELLETIER, 1971).

A maioria das raças ovulam de um a dois óvulos. As ovelhas Finnish Landrace e Romanov ovulam, normalmente, de dois a cinco óvulos. Experimentalmente tem-se demonstrado que a taxa de ovulação varia com a época do ano, raça, idade e estado nutricional da ovelha (ROBERTSON, 1984).

Durante o ciclo estral, ocorre importantes mudanças morfológicas e fisiológicas na córtex ovariana, as quais incluem crescimento e atresia folicular, ovulação, manutenção do corpo lúteo e luteólise. Essas mudanças dependem de padrões apropriados de secreção, concentrações suficientes e proporções adequadas de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) no sangue (BARROS *et al.* 1998). Estes hormônios incluem esteróides, prostaglandinas e glicoproteínas, e são todos secretados pelas células B da hipófise anterior (BINDON *et al.* 1979).

O FSH desempenha importante papel no início da formação do antro estimulando a mitose das células granulosas e formação do fluído folicular, ou seja,

o crescimento e maturação do folículo ovariano. O estradiol aumenta o efeito mitótico do FSH e auxilia na indução da sensibilidade celular da granulosa, aumentando o número de receptores de LH, com isto, prepara a luteinização destas células em resposta à onda ovulatória de LH. Por outro lado, as células da teca são estimuladas apenas pelo LH, e os receptores de LH estão presentes desde o início da formação das células tecais. A onda pré-ovulatória de LH é responsável pela ruptura da parede folicular e ovulação. A secreção de estrógenos diminui rapidamente no momento em que ocorre o pico de LH. Conseqüentemente, a atividade esteroidogênica do folículo também depende da atuação do FSH e do LH sobre as células granulosas e tecais respectivamente. O esteróide fundamental secretado é o estradiol-17 $\beta$ , sendo também produzidos pelas progestinas e andrógenos (DRAIN COURT e CAHILL, 1984; ROBERTSON, 1984; BARROS *et al.* 1998).

Qualquer que seja a duração da primeira fase de crescimento folicular, os folículos atingem o estágio de pré-antra diariamente. A partir da população de folículos recrutados, a seleção daqueles destinados a ovular é assumido pela onda pós-ovulatória de FSH (★) que ocorre antes do início da regressão do corpo lúteo na ovelha. Alguns desses folículos entram em atresia quando o FSH volta a níveis basais. Injeções de gonadotrofina exógena (PMSG/FSH) nesse estágio salvam estes folículos e permitem a superovulação (Gráfico 1) (HAFEZ *et al.* 1980).

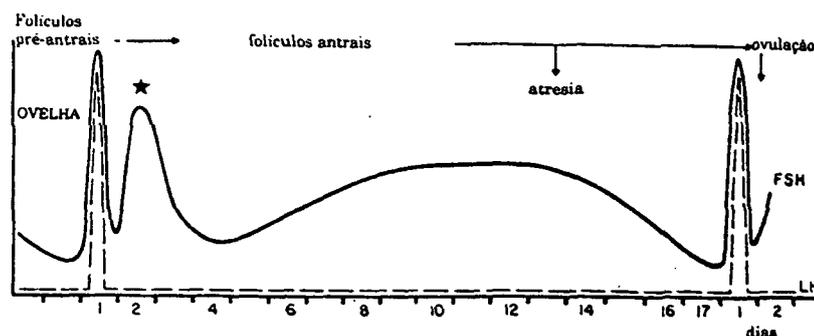


FIGURA 1 – Ondas de FSH e LH no crescimento final dos folículos destinados a ovular (HAFEZ *et al.* 1980)

LEYVA *et al.* (1998b) monitorando diariamente os folículos ovarianos de ovinos por ultrassonografia transretal durante um ciclo estral, revelaram o desenvolvimento de ondas foliculares. A maioria das ovelhas exibiram três ondas foliculares; as duas primeiras ocorreram durante o início e metade da fase luteal, respectivamente, e a última onda resultou em ovulação, sendo que, as ondas emergiram em intervalo regular de 5 a 5,5 dias desde a ovulação. A onda ovulatória emergiu em torno do 11º dia do ciclo, próxima ao início da luteólise.

Nas fêmeas ovinas os folículos de 2 mm de tamanho são requisitados, e uma vez determinada a seleção, o recrutamento é bloqueado. Carneiros Booroolas diferem dos Merinos em função do tempo maior de recrutamento, da baixa incidência de seleção, e da habilidade de folículos totalmente desenvolvidos capazes de obter o pico de LH. Em contraste, carneiros Romanov diferem das ovelhas Ile-de-France devido ao maior número de folículos recrutados entre os dias 13 e 15. É provável que sistemas diferentes de controle operem para gerar um alto nível de ovulação em raças prolíficas (DRAIN COURT e CAHILL, 1984).

Durante o cio, devido a influência do estradiol  $17\beta$ , a hipófise secreta grandes quantidades de prolactina (PRL), referenciando a iniciação da atividade funcional do corpo lúteo (ANDERSON, 1984).

Depois da ovulação aumenta o fluxo sanguíneo nas células da camada granulosa. Estas células crescem e se dividem formando uma massa sólida, o corpo lúteo (CL), que alcança seu tamanho máximo e atividade funcional aos 7 dias. Neste momento o corpo lúteo é uma glândula muito vascularizada por onde passa 97% do fluxo sanguíneo total do ovário. Esta transformação ou luteinização das células da granulosa vem acompanhada da síntese e secreção de progesterona. Na ovelha parece que a secreção de progesterona ( $P_4$ ) atinge o máximo no dia 10 do

ciclo, começando a diminuir significativamente no dia 12. A atividade secretora declina gradualmente até o dia 14 (DRAIN COURT e CAHILL, 1984 DRAIN COURT e CAHILL, 1984).

A atividade funcional do CL finaliza bruscamente no dia 15. O desaparecimento de sua atividade funcional é demasiado rápida por ser devido a falta da função luteotrófica hipofisária e por não existirem provas de que assim seja. Já que nesse momento há concentrações sanguíneas moderadas de LH e PRL, deve-se pensar em algum outro mecanismo para explicar a destruição ou lise do corpo lúteo. Experimentos anteriores apontam que existe uma interação local útero-ovárica que promove a autorregulação da atividade funcional do CL. A progesterona liberada estimula a síntese e o acúmulo de substância luteolítica no endométrio uterino. Na ovelha esta substância parece ser a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). A  $PGF_{2\alpha}$  é o agente luteolítico natural que encerra a fase luteínica do ciclo na ausência de fertilização. Tem-se encontrado níveis acima do normal de  $PGF_{2\alpha}$  no sangue venoso do útero, nos dias 15 a 16 do ciclo estral. Na ovelha, como na vaca, não é possível a lise do corpo lúteo com  $PGF_{2\alpha}$  durante os primeiros 4-5 dias de sua existência. Em animais prenhes, algum sinal desconhecido é emitido pelo embrião para o útero, prevenindo a liberação de  $PGF_{2\alpha}$ , e permitindo assim que o corpo lúteo cíclico transforme-se no corpo lúteo gravídico (FOSTER e RYAN, 1981).

Uma proteína B específica da gestação foi isolada de tecido placentário bovino, e tem uma longa vida média circulante de 7 dias. Ela pode ser detectada no sangue de vacas prenhes tão precocemente quanto 22 dias após a concepção, mas não pode ser detectada no leite ou na urina. O radioimunoensaio para proteína B detecta a substância em animais com placenta cotiledonária, como em bovinos e ovinos, porém não em suínos ou equinos. A ação fisiológica da proteína B pode

estar envolvida na indicação de uma mensagem da placenta para o animal, prevenindo a destruição do corpo lúteo (BUTLER *et al.* 1982; HAIGH *et al.* 1993).

A P<sub>4</sub> é secretada pelas células luteínicas do corpo lúteo, pela placenta e pela glândula adrenal. A secreção de progesterona é principalmente estimulada pelo LH. Ela prepara o endométrio para a implantação e manutenção da gestação através do aumento das glândulas secretoras no endométrio e também pela inibição da motilidade do miométrio. A progesterona age sinergicamente com os estrógenos para induzir o comportamento estral. Altos níveis de P<sub>4</sub> inibem o cio e a onda ovulatória de LH. Deste modo, a progesterona é importante na regulação hormonal do ciclo estral (ROBERTSON, 1984).

O controle da vida do corpo lúteo ou manipulação da concentração de progesterona circulante permite a regulação do estro e ovulação (HANSEL e CONVEY, 1983). Progesterona exógena ou seus análogos, quando administrados por 12 a 14 dias, promove regressão do corpo lúteo, mas o estro e a ovulação só ocorrem quando a progesterona exógena é retirada. LEYVA *et al.* (1998b) em seu estudo evidenciaram que o prolongamento do ciclo estral em ovelhas com progestágenos aumentou o número de ondas foliculares e também reduziu ou aumentou o tamanho de grandes folículos. Este efeito foi causado por variações nas concentrações de progesterona endógenas e exógenas, as quais alteraram o comportamento pulsátil do LH.

## 2.2. Anestro sazonal

O anestro em ovinos é caracterizado por ausência do estro e da ovulação devido ao decréscimo da frequência do pulso de LH em resposta ao aumento da sensibilidade hipotalâmica para o “feedback” negativo do efeito estrogênico (GOODMAN *et al.* 1982; LEGAN e KARSH, 1980). A ocorrência de algum crescimento folicular durante o anestro, mais frequente pequenos e médios folículos do que grandes, sugere que um suporte parcial de gonadotrofinas está presente neste momento (MATTON *et al.* 1977).

Os ovinos são poliéstricos estacionais e se reproduzem quando há diminuição da luminosidade, isto é, no fim do verão, outono e início do inverno com ciclo estral em períodos regulares de 16-17 dias. São também chamados de animais de dias curtos (SHORT, 1982).

A duração da estação sexual varia principalmente com o comprimento do dia, raça e nutrição. Nas latitudes das zonas temperadas, a maioria das raças ovinas tornam-se anovulatórias e anéstricas durante a primavera. Nas zonas tropicais, onde há menor variação na luz diária, os ovinos tendem a se reproduzir durante o ano todo. Por esse motivo, quando as raças de zonas temperadas são levadas para os trópicos, elas perdem gradativamente a estacionalidade, seguindo os padrões reprodutivos característicos do novo ambiente (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995). Segundo BROWN e JACKSON (1995) a resposta reprodutiva de animais que são transportados de latitudes altas para próximas de zero grau e vice-versa, é pouco conhecida.

O comportamento reprodutivo das ovelhas é fortemente influenciado pelos efeitos hormonais. Com o declínio da luminosidade diária ocorre um aumento da

secreção de melatonina que é sintetizada pela glândula pineal, e é tida como mediadora dos efeitos do fotoperiodismo. Conseqüentemente o nível de melatonina influencia a produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, o qual controla a liberação de LH e FSH hipofisário. Esses últimos hormônios são importantes para o funcionamento normal dos ovários produzindo os esteróides necessários para iniciar o comportamento estral e promover a ovulação (LYNCH *et al.* 1992).

Conforme REEVES (1986), os quatro principais componentes a serem considerados no modelo de controle hipotalâmico da estação anéstrica da ovelha são: o ambiente externo (comprimento do dia), hipotálamo, hipófise e ovário. Durante a estação anéstrica ou dias longos, a ovelha não demonstra atividade cíclica reprodutiva. A duração de horas de luz por algum mecanismo, talvez pelo nervo ótico, sensibiliza o centro tônico de LH no hipotálamo às concentrações circulantes de estrógenos. Então, o estrógeno retroage negativamente sobre o centro tônico de controle do LH, diminuindo a liberação de LH-RH. Menos LH tônico é liberado para a circulação, resultando em menor produção de estrógenos do folículo ovariano. As concentrações de estrógenos circulantes não podem atingir um limiar para estimular o centro pré-ovulatório do LH no hipotálamo, resultando na falha da ovulação durante a estação anéstrica.

Durante o período reprodutivo da ovelha, o comprimento do dia diminui e o centro tônico de controle de LH do hipotálamo torna-se refratário ao estrógeno circulante. O aumento dos níveis de estrógenos não afeta negativamente o centro tônico de controle de LH nesta ocasião, resultando no aumento da liberação de LH-RH, o que induz a uma liberação tônica aumentada de LH da hipófise. A liberação tônica aumentada de LH induz suficientes níveis de estrógenos na circulação para

estimular o centro pré-ovulatório de LH do hipotálamo, resultando em liberação aumentada de LH-RH. A onda pré-ovulatória resultante de LH induz a ovulação (REEVES, 1986).

MOORE (1982), WALKER *et al.* (1987), encontraram pouca influência estacional na resposta ovulatória de ovelhas Merino e SAMARTZI *et al.* (1995) em ovelhas Chios submetidas a esquemas com progestágenos combinados com PMSG ou FSH. Mas encontraram significativa diferença quanto ao intervalo entre a retirada do progestágeno e o momento do estro que foi mais curto no outono do que na primavera.

SAMARTZI *et al.* (1995) e SEBASTIAN *et al.* (1990) não encontraram diferença significativa em relação ao número de ovulações, taxa de recuperação e número de embriões coletados durante a primavera e o outono.

TORRES *et al.* (1987), ao comparar a coleta de embriões em ovelhas Lacaune durante a estação reprodutiva e o anestro encontraram diferença significativa quanto ao número de corpos lúteos e embriões recuperados (11,2 e 9,3 contra 8,4 e 7,1).

### **2.3. Sincronização do cio**

A estacionalidade na reprodução limita a taxa reprodutiva da ovelha a um parto por ano. A manipulação da reprodução por métodos genéticos, fisiológicos e ambientais pode aumentar a frequência de montas por ano assim como o número de descendentes (CHEMINEAU *et al.* 1989).

Para a aplicação da técnica de transferência de embriões (TE) é necessário um controle efetivo do estro, para que o tratamento superovulatório ocorra no

O controle do momento da ovulação permite a pré-determinação da data da transferência para receptoras, assim como o período mais adequado para iniciar a superovulação e a cobertura das doadoras (NEVES, 1989).

A manipulação do estro e o controle da ovulação em ovelhas pode ser conseguido reduzindo a fase lútea com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ou aumentando esta fase com a utilização de progestágenos exógenos. Os métodos que utilizam  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dependem da presença do corpo lúteo, e só podem ser usados em fêmeas que estão ciclando naturalmente. No entanto, existem diferentes análogos de progesterona sendo empregados no controle do estro e ovulação em ovelhas. Cada um deles com seu modo de administração, o que requer bons e eficazes experimentos para determinar a dose eficiente e as condições de uso. Além disso, existem diferenças significativas entre raças conforme o progestágeno e a forma de administração (CHEMINEAU *et al.* 1989; BASIOUNI *et al.* 1996).

Em ovelhas, folículos nos ovários que contém corpos lúteos crescem mais rapidamente do que os folículos nos ovários sem corpos lúteos. Tal efeito pode ser mediado por diferenças nas concentrações locais de progesterona nos dois ovários. A progesterona pode atuar sistematicamente e localmente para alterar as modificações dependentes do tempo quanto ao tamanho do folículo, tomando possível alguns folículos crescerem enquanto outros sofrem atresia (DRAIN COURT e CAHILL, 1984). Em geral, a progesterona têm sido associada com supressão do crescimento folicular e ovulação, agindo via eixo hipotálamo-hipófise-ovários e com possível ação direta no ovário (KARSCH *et al.* 1977).

Durante o anestro, a ovulação pode ser induzida com LH ou GnRH exógenos, mas estes tratamentos sempre resultam em alta proporção de ovelhas com

prematura regressão luteal (CRIGHTON *et al.* 1975; McLEOD e HARESIGN, 1984; LEGAN *et al.* 1985; McNEILLY *et al.* 1986; HUNTER *et al.* 1986).

Outro regime de hormônio exógeno utilizado para induzir a fertilidade em ovelhas anéstricas, e que pode evitar o problema descrito acima (McLEOD e HARESIGN, 1984; HUNTER *et al.* 1986), consiste no tratamento com progestágenos em concentrações e pelo período que promovam uma fase lútea.

Esponjas intravaginais são comumente utilizadas para administrar progestágenos porque são de fácil aplicação. Análogos potentes de progesterona, como o acetato de fluorogestona (FGA) e o acetato de medroxiprogesterona (MAP), são incorporados dentro das esponjas. Os resultados de diversos estudos tem mostrado que os análogos são efetivos em quantidades muito menores que a própria progesterona na supressão do estro (ROBINSON, 1976). NOEL *et al.* (1994) verificaram que a utilização de FGA acelerou os mecanismos de crescimento folicular, aumentou a taxa de atresia e reduziu a média do número de grandes folículos.

Outra alternativa de administração de progestágenos sintéticos são os implantes subcutâneos feitos de uma sólida borracha de silicone impregnado com um potente composto sintético, o Norgestomet. O nível de progesterona em ovelhas tratadas com estes implantes aumenta as concentrações rapidamente, e depois diminui gradualmente, preparando a descarga de hormônios hipofisários e aumentando a sensibilidade dos órgãos sexuais aos estímulos das gonadotrofinas. No momento da retirada do implante, o bloqueio cessará bruscamente, fazendo com que as fêmeas, de forma sincronizada entrem numa fase que dará lugar ao estro e ovulação (RUTTLE *et al.* 1988; VALLET *et al.* 1990). Os resultados dos estudos em

ovulação (RUTTLE *et al.* 1988; VALLET *et al.* 1990). Os resultados dos estudos em que se comparam implantes de progestágenos com esponjas (MAP) indicam que os implantes são tão bons se não melhores do que as esponjas (HAMRA *et al.* 1986).

Também existe o dispositivo interno de liberação controlada de droga ("controlled internal drug-release device" - CIDR), um pessário intravaginal constituído de uma estrutura plástica com uma extremidade de silicone flexível impregnado com 9% ou 12% de progesterona. HAMRA *et al.* (1986), obtiveram níveis de progesterona maiores com o CIDR do que com implante de progestágeno. Elevados níveis de progesterona no momento da retirada do progestágeno exógeno retardam o tempo de surgimento da onda pré-ovulatória de gonadotrofina.

Diversos tratamentos para efetiva sincronização de cio têm sido empregados, além do uso de PMSG (PEARCE *et al.* 1986), GnRH (WALKER *et al.* 1989; HARESIGN *et al.* 1996) e progesterona (HAMRA *et al.* 1986), inclui-se o uso de melatonina (HARESIGN *et al.* 1990; SEBASTIAN e INSKEEP, 1991), manipulação da luminosidade e/ou efeito macho (MARTIN *et al.* 1986; NUGENT III *et al.* 1988), com vários graus de sucesso durante o período de anestro (NOWAK *et al.* 1990; AKINLOSOTU e WILDER, 1993).

#### **2.4. Superovulação**

A taxa de ovulação marca o limite superior do número de crias, sendo estas um determinante fundamental da eficiência biológica na produção de carne, especialmente nos ruminantes. Existe uma grande variação inter e intraracial em ovelhas em relação à taxa de ovulação. Esta variação pode ser explorada para obter maior prolificidade em uma determinada população (MARAI e OWEN, 1994).

Muitos pesquisadores têm estudado maneiras de melhorar a eficiência da múltipla ovulação e da transferência de embriões (ARMSTRONG e EVANS, 1983; TORRES *et al.* 1987; MURRAY *et al.* 1994; SAMARTZI *et al.* 1995); e a área mais difícil e conflitante é o tratamento de superovulação. As drogas que se utilizam são várias e sua composição biológica não é sempre a mesma, nem tão pouco sua origem. Também são diferentes os esquemas de administração conforme a meia vida de cada droga (CAMPARA, 1991).

Os tratamentos superovulatórios comumente utilizam injeções subcutâneas ou intramusculares de gonadotrofina sérica de égua prenhe ou hormônio folículo estimulante que são aplicadas para estimular um crescimento folicular adicional, assim como a maturação folicular. A produção de embriões normais aumenta em aproximadamente cinco vezes na vaca, cabra e ovelha. Em todas as espécies existem extremas variações individuais nas respostas. Muitas doadoras não produzem embrião normal, enquanto poucas produzem grande número. Aproximadamente metade dos embriões recuperados de grande grupo de doadoras superovuladas são tipicamente produzidos por um quarto das doadoras. Não é possível prever como irá responder uma determinada doadora (ARMSTRONG e EVANS, 1983).

A PMSG é uma glicoproteína com subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  similares ao LH e FSH, porém com conteúdo maior de carboidratos, especialmente ácido siálico. O conteúdo maior de ácido siálico parece contribuir para a longa meia-vida de vários dias. Uma única injeção de PMSG possui efeitos biológicos sobre a glândula-alvo por mais de uma semana. Essa gonadotrofina, comumente usada em programas de reprodução assistida em ovinos, possui ações biológicas de FSH e de LH, sendo dominante as ações de FSH, estimulando o crescimento de folículos ovarianos

(MURRAY *et al.* 1994). Elevadas doses de PMSG estão associadas a efeitos colaterais ( muitos folículos anovulatórios e baixas taxas de colheita) em significativo número de animais (SAMARTZI *et al.* 1995).

O hormônio folículo estimulante é uma glicoproteína envolvida no processo de seleção folicular e seu controle (GREENWALD e TERRANOVA, 1989). Preparações comerciais, normalmente extraídas de pituitária de suínos, têm sido usadas com frequência para superovular bovinos (CHUPIN *et al.* 1985; LINDSELL *et al.* 1986; ARMSTRONG, 1993), caprinos (ARMSTRONG e EVANS, 1983) e ovinos (BONDURANT, 1986; TORRES *et al.* 1987; SEBASTIAN *et al.* 1990). Possui meia-vida curta sendo indispensável diversas injeções em doses constantes ou decrescentes (WALLACE, 1992; ARMSTRONG, 1993). Segundo NEVES (1989), extratos pituitários parecem ser as gonadotrofinas de escolha, mas são mais dispendiosos e difíceis de se obter do que o PMSG.

O maior problema a ser enfrentado num programa de transferência de embriões em ovinos consiste nas diferentes respostas ovulatórias das doadoras frente a doses padrões de gonadotrofinas (TORRES *et al.* 1987; MAURER, 1988; SEBASTIAN *et al.* 1990). Este problema, entretanto, não é exclusivo desta espécie (MOORE, 1982).

Sabe-se que em bovinos a correta dosagem de gonadotrofinas é crucial para o sucesso do tratamento superovulatório. As pesquisas que utilizam FSH indicam que altas doses de gonadotrofinas resultam em reduzida qualidade dos embriões sem o aumento na resposta ovulatória (LINDSELL *et al.* 1986). BUNCH *et al.* (2000) concluiu que a resposta superovulatória e subsequente coleta de embriões em ovinos são dependentes das dosagens de FSH e dos métodos de administração das gonadotrofinas. SEBASTIAN *et al.* (1990), confirma que a forma de

administração afeta os resultados, pois, o número de ovulações, de embriões colhidos e de embriões viáveis foi maior quando forneceu-se 16 mg de FSH em doses decrescentes por três dias seguidos do que por dois dias de tratamento. TORRES *et al.* (1987), obtiveram melhores respostas superovulatórias quando o FSH foi administrado em doses decrescentes do que em doses iguais. Estes mesmos autores administraram doses diferentes de FSH, 12 mg e 16 mg, para ovinos da mesma raça e obtiveram, respectivamente, 6 e 9 ovulações. A resposta também variou quando eles forneceram doses iguais à ovelhas de raças diferentes. A raça Pré-alpina produziu a média de 9 corpos lúteos, a Lacaune produziu 12 e a Romanov x Pré-alpina 19. A mesma dose de FSH em raças mais prolíferas induziu maiores taxas de ovulação (TORRES *et al.* 1987).

MOORE (1982), utilizando 1000 a 1200 UI de PMSG ou um total de 50 a 60 mg de FSH obteve 10 a 12 ovulações em ovelhas Merino (40 kg), enquanto que 1400 a 1500 UI de PMSG ou 70 a 80 mg de FSH induziu 12 a 15 ovulações em ovelhas da raça Border-Leicester.

MAURER (1988) verificou o efeito de dois regimes de aplicação de FSH na resposta ovariana, comparativamente nas raças Suffolk e Dorset. As aplicações de FSH em doses decrescentes proporcionaram melhores respostas em relação a doses constantes. As ovelhas Suffolk não diferiram significativamente da Dorset em número de corpos lúteos, mas produziram maior número de embriões viáveis (4,4 contra 1,4).

Esta variação na taxa de ovulação, além de depender da dose, raça, condição nutricional, idade e período do ano (TORRES *et al.* 1987; NEVES, 1989), pode estar associada à variação da bioatividade e da meia-vida do FSH em diferentes partidas do mesmo produto comercial. Estes produtos contêm hormônio extraído de pituitária

de animais domésticos com “status” reprodutivo desconhecido o que acarreta concentrações variáveis de hormônios e alterações na composição química (LINDSELL *et al.* 1986; ULLOA-AGUIRRE e MIDGLEY, 1995). Também há interferência associada à contaminação de LH nas preparações de FSH, as quais igualmente, mostraram variações entre partidas do mesmo produto (LINDSELL *et al.* 1986). No entanto, suspeita-se que alguma atividade de LH é requisitada à boa superovulação, mas os níveis adequados não são conhecidos (BRAILEANU *et al.* 1998).

## 2.5. Fertilização

Em ovelhas superovuladas, a falha na fertilização é relativamente comum depois da monta natural ou inseminação cervical, particularmente em ovelhas tratadas com altas doses de gonadotrofina. A estrutura sinuosa da cérvix da ovelha dificulta a precisa deposição do sêmen, diminuindo as chances de fertilização (MOORE, 1982; BARI *et al.* 2000). A sincronização do estro e a superovulação também interferem no transporte espermático na cérvix, comprometendo, assim, a taxa de fertilização e a produção de embriões de qualidade (ALLISON e ROBINSON, 1970). A inseminação intra-uterina com laparoscópio, evitando a passagem pela cérvix, pode ser um método eficiente para aumentar a fertilidade (RODRIGUEZ *et al.* 1988). No entanto, tem-se obtido baixas taxas de colheita de embriões, devido, provavelmente, a manipulação do trato reprodutivo durante a inseminação e ao tempo correto entre a retirada do progestágeno e a inseminação (EVANS e ARMSTRONG, 1984; MAXWELL *et al.* 1986).

BOLAND e GORDON (1978) compararam cobertura natural com inseminação uterina por laparoscopia em ovelhas da raça Galway superovuladas após tratamento com pessários vaginais impregnados com progesterona e extrato pituitário cru de equino (HAP). A percentagem de fecundação foi significativamente maior nas inseminadas (91,5% contra 69%). No entanto, a recuperação de embriões foi menor (44,5% contra 60,8%). Quando a recuperação de embriões ocorreu mais tardiamente (96 horas), evidenciou-se que a aplicação intra-uterina de sêmen promove expulsão ou rápido transporte de embriões devido a uma antecipação da ovulação.

Segundo EVANS *et al.* (1986), os índices de fecundação de ovelhas superovuladas são elevados utilizando-se sêmen fresco em relação ao congelado, mesmo que a aplicação seja intra-uterina por laparoscopia.

Conforme MAXWELL *et al.* (1986), o início do estro em ovelhas superovuladas ocorre 24 a 36 horas após a retirada do progestágeno. De acordo com TORRES *et al.* (1987), a superovulação e o número de embriões de boa qualidade, possíveis de serem transferidos, variam de acordo com o intervalo entre a remoção do progestágeno e o estro. Com intervalo de 24 horas o número médio de corpos lúteos e a percentagem de mórulas foram mais altos em relação aos obtidos com 36 horas de intervalo. O intervalo de 48 horas apresentou-se desfavorável.

## **2.6. Colheita de Embriões**

A maioria das colheitas de embriões ovinos são realizadas cirurgicamente, por meio de laparotomia médio-ventral e anestesia geral. O método usado depende do estágio do ciclo no qual os embriões serão colhidos. Os embriões podem ser

retirados do oviduto, a partir do terceiro ou quarto dia do ciclo; ou do corno uterino, a partir do quinto dia, através de retrolavagem com solução própria para cultura de zigotos (WALLACE, 1992). A solução é injetada por uma cânula ou agulha romba no oviduto ou no lúmen do corno uterino e então recolhido na base do corno uterino, sendo obstruída a passagem do líquido para a bifurcação pelo uso de cateter de Foley. Ambos os métodos resultam em aceitáveis taxas de colheita (> 80%). No entanto, é preferível colher os embriões diretamente do corno uterino devido ao menor risco de aderências pós-operatórias, pois a manipulação do trato reprodutivo é menor. (BONDURANT, 1986; WALLACE, 1992).

SMITH e MURPHY (1987) utilizaram basicamente a técnica anteriormente descrita, com volume de meio de lavagem de 60 a 120 ml, somente no útero, obtendo 65% de recuperação de embriões. Segundo esses mesmos autores, as ovelhas submetidas à colheita por este método não apresentaram aderências nos ovidutos e ovários, indicando que este método é pouco traumático. A integridade dos órgãos genitais foi confirmada pelo fato de que todas as doadoras conceberam posteriormente.

As limitações dos atuais tratamentos superovulatórios exigem que fêmeas nos programas de melhoramento genético sejam lavadas repetidamente. A formação de aderências após as colheitas cirúrgicas limita o número de vezes que o animal pode ser "lavado" e frequentemente compromete sua habilidade de procriar naturalmente (WALLACE, 1992). Por esta razão Mc KELVEY e ROBINSON (1984) utilizaram a técnica de laparoscopia para colheitas de embriões. O procedimento é semelhante à lavagem uterina cirúrgica exceto que toda a manipulação do trato reprodutivo é substituído pelo uso de três trocâters, um para colocação da ótica, outro para a sonda coletora de embriões e o último para o forceps que fixa o útero permitindo a

punção do mesmo com uma agulha romba, na extremidade do corno. O meio de lavagem é injetado no sentido da extremidade do corno para a sonda e recolhido em um recipiente. Mc KELVEY *et al.* (1986) verificaram a eficiência do método ao colherem embriões de ovelhas superovuladas em três ocasiões dentro do período de dois meses (35%, 76% e 66% de embriões colhidos na primeira, segunda e terceira colheita respectivamente), e concluíram que apesar da taxa de recuperação de embriões ser menor do que na colheita cirúrgica, é mais compensador pela possibilidade de repetições sem apresentar aderências pós-operatórias.

Métodos de colheita não cirúrgica via cérvix têm sido documentado em ovinos e caprinos. Utilizando este procedimento, COONROD *et al.* (1986) reportaram que um sistema de cateter inserido através da cérvix tracionada permitiu que embriões fossem colhidos em 11 de 26 fêmeas estudadas. O método não foi apropriado para todas as ovelhas, provavelmente devido a natureza tortuosa do canal cervical.

Aos quatro dias pós ovulação, o embrião penetra no útero através do ístmo útero-tubárico. Portanto, conforme PEMBERTON (1987), a colheita nos dias 5 a 7 é mais vantajosa porque a maioria dos embriões já se encontra no útero.

Diversos meios de cultivo têm sido usados com sucesso. Todos são basicamente constituídos de solução salina tampão enriquecida com proteínas. O meio mais utilizado para colheitas de embriões é o "Dulbecco's Phosphate-Buffered saline" (PBS), suplementado ou não com soro fetal bovino ou ovino, antibióticos e aquecido a 37°C (NEVES, 1989).

Os embriões podem ser recuperados dos cornos uterinos após deixarem as trompas, geralmente cinco dias após o cio ou mais tarde. Depois da colheita da doadora, os embriões são examinados com microscópio estereoscópico e uma pipeta fina é usada para movê-los dentro do meio de cultura fresco a fim de

examinar a morfologia. Apenas embriões morfologicamente normais devem ser transferidos; todavia, alguns que pareçam morfologicamente anormais podem desenvolver-se e gerar produtos normais (ELSDEN *et al.* 1978). A decisão de transferir ou não embriões de inferior qualidade ou de desenvolvimento atrasado depende dos objetivos da transferência. Em programas comerciais, o objetivo é obter significativa quantidade de descendentes de determinada doadora. Como animais receptores existem em boa quantidade, embriões em estágio retardado de desenvolvimento poderiam ser transferidos, possibilitando que uma proporção deles se adapte e desenvolva-se no útero receptor (WALLACE, 1992).

## 2.7. Qualidade dos Embriões

Estágios de desenvolvimento embrionário normalmente encontrados em várias épocas após a ovulação são descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998). É atribuído código numérico para estágios de desenvolvimento, variando de "1", oócito não fecundado ou embrião de uma célula, a "9", blastocisto expandido eclodido (Figura 1). O código para qualidade do embrião é também numérico e é baseado na integridade morfológica dos embriões. Os códigos variam de "1" a "4", como segue:

**Código 1:** Excelente ou bom. Possui massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros (células) individuais, que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Este embrião é consistente com o estágio esperado de desenvolvimento. Irregularidades devem ser relativamente menores, e ao menos 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável intacta. Este julgamento deve ser baseado na percentagem de células embrionárias representadas pelo material

extravasado no espaço perivitelino. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas, que possam causar aderência do embrião à placa de Petri ou a uma palheta.

**Código 2:** Regular. Possui irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável, intacta.

**Código 3:** Pobre. Possui irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular deve formar uma massa embrionária viável, intacta.

**Código 4:** Morto ou degenerado. Embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.

Segundo STRINGFELLOW e SEIDEL (1998), deve-se reconhecer que a avaliação visual de embriões é avaliação subjetiva de um sistema biológico e não é ciência exata. Ainda mais, há outros fatores tais como condições de ambiente, qualidade das receptoras e capacitação técnica que são importantes para a obtenção de gestações após a transferência de embriões.

Estes mesmos autores reconhecem que muitos sistemas diferentes são utilizados para elevar a qualidade dos embriões e alguns sistemas são mais sofisticados que outros. O critério de atribuir “código de qualidade” em formulários específicos é para tentar padronizar a classificação a nível internacional. Deve-se selecionar o código mais apropriado para satisfazer à condição do embrião observado. Geralmente, apenas embriões código “1” devem ser utilizados no comércio internacional.

Os embriões em estágio inicial ou muito tardio podem desenvolver-se num ambiente adequado, porém os índices de sucesso podem ser baixos. Em maior

percentual os embriões entre os estágios de mórula e blastocisto resultam em índices de gestação mais elevados. Embriões defeituosos mostrando qualquer uma das seguintes anomalias devem ser descartados: blastômeros de tamanhos variáveis, não uniformes; restos celulares na mórula; blastocisto degenerado dentro da zona pelúcida; figura de desintegração mitótica; blastômeros espumosos indistintos; fragmentação do material citoplasmático e nuclear; forma anormal da mórula ou blastocisto devem ser descartados.

Recentes pesquisas sugerem que a qualidade do embrião está relacionada com a pré-exposição à progesterona no momento da administração do hormônio superovulatório. Conforme SCUDAMORE *et al.* (1992), ovelhas foram preparadas e sincronizadas para ovular com pessários intravaginais contendo 30 e 40 mg de progestágeno sintético. Para superovulação foi usado PMSG e GnRH e as ovelhas foram inseminadas 48 horas depois da retirada do pessário. A taxa de ovulação não foi influenciada pelo nível de progestágeno. O desenvolvimento embrionário atingido no dia 3 foi similar para ambos os níveis de progestágeno com 96% dos embriões sendo  $\geq$  a 16 células. No entanto, no dia 6 somente, 44% dos embriões recuperados do grupo com 30 mg de progestágeno estavam no estágio de desenvolvimento esperado (mórula e blastocisto) comparado com 88% dos embriões recuperados do grupo com 40 mg. A sobrevivência dos embriões que foram transferidos para receptoras sincronizadas foi reduzida a 13 e 19% respectivamente para embriões originários de doadoras que receberam 30 mg e 40 mg de progestágenos. Similarmente, a taxa de ovulação e o número de embriões viáveis aumentou quando ovelhas foram estimuladas por 12 dias com dois dispositivos intra-uterinos do que quando utilizou-se apenas um dispositivo interno de liberação controlada de droga (CIDR) (THOMPSON *et al.* 1990). Estes estudos sugerem que os níveis de

exposição à progesterona antes da superovulação podem influenciar o crescimento folicular, o desenvolvimento embrionário e/ou o meio ambiente uterino por mecanismos ainda desconhecidos (WALLACE, 1992).

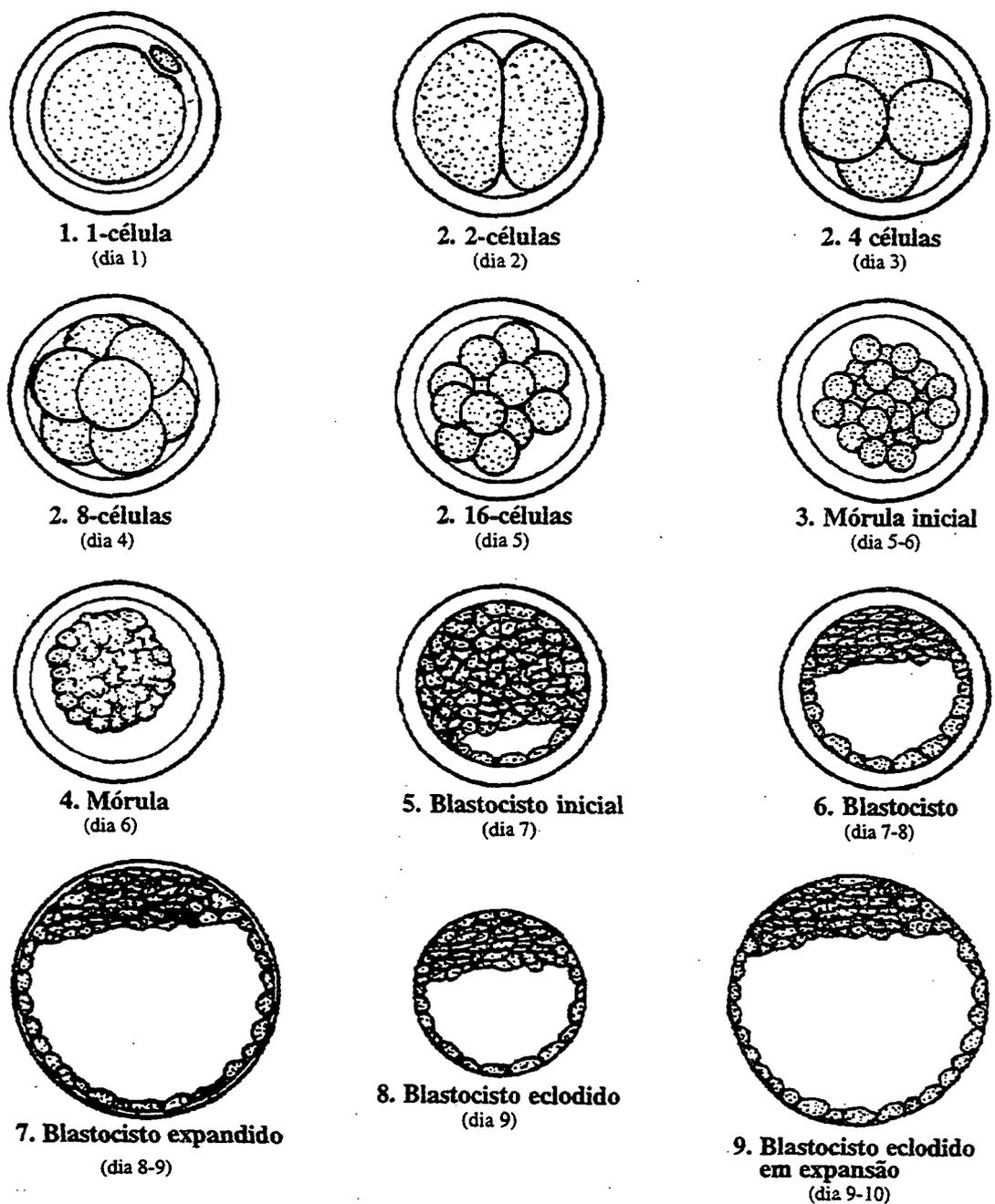


FIGURA 2. Estágios de desenvolvimento do embrião. O código para estágio de desenvolvimento é numérico. O número 1 identifica um oócito não fecundado ou embrião de uma célula. O número 2 identifica embriões com 2 a 16 células. O número 3 identifica uma mórula inicial e os números 4 a 9 identificam embriões nos estágios pós compactação, conforme ilustrado acima. Na transferência comercial de embriões, os mesmos são colhidos nos dias 5 a 7 do ciclo estral de ovinos (mórula a blastocisto) (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998)

## 2.8. Importância da Transferência de embriões

Segundo EVANS *et al.* (1984), BONDURANT (1986) e MAPLETOFT (1987), a transferência de embriões (TE) em ovinos é justificável, principalmente, pelas seguintes razões: aumentar o número de animais de alta qualidade; exportar e importar embriões introduzindo novas raças e linhagens sanguíneas, evidenciando as vantagens econômicas e sanitárias em relação ao comércio de animais, ou quando o transporte internacional é restrito; incrementar benefícios da cobertura fora da estação reprodutiva, como também, permitir a manipulação de embriões e a aplicação da engenharia genética.

Pela análise dos benefícios econômicos potenciais da TE em bovinos, chegou-se a conclusão de que os produtores não poderiam justificar a aplicação deste procedimento simplesmente para aumentar a produção de carne ou leite em seu rebanho. Pelo contrário, pode ser justificado para produzir maior quantidade de animais jovens para venda (WILMUT e HUME, 1978). Uma situação comparável ocorre com os ovinos, ao se utilizar essa técnica para incrementar o número de animais de alto potencial genético destinando-os à venda, e também empregando-os nos programas de seleção para a melhoria da cabanha nacional (MARAI e OWEN, 1994).

### **3. Material e Método:**

#### **3.1. Local, período e animais utilizados**

O experimento foi conduzido no setor de ovinocultura, na Fazenda Experimental do Canguiri – UFPr, Pinhais-Pr, latitude 25°S e longitude 49°O, durante os meses de outubro e novembro de 1998, correspondente ao período de baixa sazonalidade reprodutiva dos ovinos.

Foram utilizadas 15 ovelhas adultas Suffolk, histórico reprodutivo dentro dos padrões fisiológicos; 2,5 anos de idade, peso em torno de 55,3 kg e escore corporal variando entre 3 e 4, as quais permaneceram sob condições similares de manejo e com alimentação a base de pasto, silagem de milho e ração nas mesmas proporções para todos os animais.

#### **3.2. Sincronização do cio**

Em cada ovelha foi colocado um implante auricular com progestágeno durante 12 dias contendo 1,5 mg de Norgestomet (CRESTAR® - Intervet).

Após 12 dias procedeu-se a retirada do progestágeno permanecendo as fêmeas com dois reprodutores Suffolk por 72 horas para cobertura natural.

### **3.3. Tratamento superovulatório**

As fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de oito e sete animais, respectivamente, com protocolos de superovulação diferentes. O primeiro grupo - tratamento I - recebeu 250 UI de Hormônio Folículo Estimulante - FSH (PLUSET® - Serono) divididas em doses de 75, 75, 50, 50 UI, administradas por via intramuscular em intervalos de 12 horas a partir do décimo dia após a implantação do progestágeno. O segundo grupo – tratamento II - recebeu 1000 UI de Gonadotrofina Sérica de Égua Prenhe - PMSG (FOLLIGON® – Intervet) em dose única por via intramuscular no décimo primeiro dia após o implante do progestágeno.

### **3.4. Coleta de embriões**

A coleta de embriões realizou-se no sétimo dia após a retirada do implante do progestágeno. Foi utilizado uma adaptação do método cirúrgico descrito por SMITH e MURPHY (1987). Sob sedação (cloridrato de dihidrotiazina a 2% - Rompun) e anestesia local (cloridrato de lidocaína 2% - Bravet) foi feita uma incisão na linha alba permitindo a exteriorização do útero e dos ovários.

A contagem dos corpos lúteos visíveis foi feita pela observação dos ovários e em seguida os cornos uterinos foram lavados com 40 ml de meio de lavagem (Dulbecco's phosphate-buffered saline – PBS) introduzidos através de agulha, próximo ao ápice do corno uterino, e recolhido na outra extremidade por cateter flexível (cateter de Foley nº 10). Cada corno uterino foi lavado independentemente,

sendo o cateter flexível mudado de posição através da mesma incisão, e o líquido injetado no ápice do outro como.

O meio era recolhido em filtro e colocado em placas de Petri para observação em microscópio estereoscópico. Os embriões encontrados foram classificados pelo grau de desenvolvimento e integridade estrutural. Aqueles que se apresentavam em estágio de mórula e blastocisto com pouca ou nenhuma extrusão citoplasmática foram considerados embriões de elevada viabilidade, aptos à transferência; os embriões atrasados ou degenerados foram descartados (considerados de baixa viabilidade).

### **3.5. Determinação dos níveis de progesterona**

As amostras de sangue foram colhidas antes de iniciar o tratamento de sincronização do cio (dia 0), durante o período de permanência do implante com progestágeno (dia 10) e no dia da coleta dos embriões (dia 19).

As concentrações de progesterona no plasma sanguíneo foram avaliadas através de um "kit" comercial de radioimunoensaio –  $I^{125}$ , fase sólida (Coat-A-Count Progesterone).

O plasma (0,1 ml) foi colocado com 1 ml de solução de progesterona marcada com  $I^{125}$  em cada tubo de ensaio de polipropileno contendo anticorpo. Depois de quatro horas de incubação (15 – 28°C), o líquido era aspirado e os tubos deixados para secar. Dados específicos listados no manual indica uma alta especificidade para progesterona e uma baixa reatividade cruzada com 19 esteróides de ocorrência natural ou drogas terapêuticas que podem estar presentes nas amostras de plasma. As amostras foram determinadas de uma vez só, após a calibração, em um contador

gama. A sensibilidade deste teste é de aproximadamente 0,02 ng/ml e os coeficientes intraensaio e interensaio são, respectivamente, 8,8% e 9,7%.

### **3.6. Análise estatística:**

A significância estatística da diferença entre as médias encontradas foi determinada pelo teste “t” de “Student”, tanto para comparar dados entre os tratamentos como entre cada índice avaliado. O teste de significância do  $\chi^2$  foi utilizado para comparar os valores em percentagem (nível de significância). Para obter a relação entre duas variáveis utilizou-se o coeficiente de correlação.

#### 4. Resultados:

Conforme observação do número de corpos lúteos por laparotomia, 93,3% das ovelhas responderam aos tratamentos superovulatórios. Apenas uma das quinze fêmeas não apresentou corpo lúteo, não se fazendo a lavagem uterina e ficando excluída dos cálculos estatísticos (Tabela 1).

TABELA 1 – PERCENTAGEM DE OVELHAS EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO DE CL E MÉDIAS DE CL POR OVELHAS SUPEROVULADAS COM FSH E PMSG FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA – PINHAIS (Pr) – NOV. 1998

Tratamentos	n	% DE OVELHAS COM N° DE CL		N° CL / OVELHA $\bar{x} \pm s$
		≤ 4 (n)	≥ 5 (n)	
FSH	7	0 (0)	100 (7)	10,6 <sup>a</sup> ± 2,8
PMSG	7	43 (3)	57 (4)	4,4 <sup>b</sup> ± 2,8

<sup>ab</sup> Médias da mesma coluna seguidas de letras diferentes diferiram significativamente (P<0,05)

Pela análise dos resultados (Tabela 1), verifica-se que a utilização do hormônio FSH (tratamento I) para superovulação proporcionou médias significativamente superiores (P<0,05) quanto ao número de ovulações comparativamente ao tratamento II utilizando-se PMSG. Observa-se, ainda, que todas as ovelhas tratadas com FSH produziram 5 ou mais corpos lúteos (Figura 3).

Houve diferença significativa (P<0,05) em favor do tratamento com FSH quanto a taxa de recuperação dos embriões e quanto ao número de ovelhas que produziram embriões viáveis, ao se comparar com o grupo PMSG (Tabela 2).

TABELA 2 – PERCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO, DE FERTILIZAÇÃO DE ÓVULOS E DE OVELHAS QUE PRODUZIRAM EMBRIÕES VIÁVEIS QUANDO TRATADAS COM FSH OU PMSG FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA (n=7) – PINHAIS (Pr) – NOVEMBRO 1998

Tratamentos	TAXA (%)		
	Recuperação <sup>1</sup>	Fertilização <sup>2</sup>	Ovelhas c/ embr. viáveis <sup>3</sup>
FSH	58,1 <sup>a</sup>	86,0 <sup>a</sup>	71,4 <sup>a</sup>
PMSG	35,5 <sup>b</sup>	81,8 <sup>a</sup>	28,6 <sup>b</sup>

1- número de embriões colhidos pelo número de ovulações;

2- número de óvulos fertilizados pelo total de embriões colhidos;

3- número de ovelhas que produziram embriões viáveis pelo total de ovelhas de cada tratamento;

<sup>ab</sup> Médias da mesma coluna seguidas de letras diferentes diferiram significativamente (P<0,05)

Ao se analisar a Tabela 3, observa-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no número de embriões colhidos e embriões viáveis, em prol do tratamento com FSH, porém não houve diferença na proporção de embriões viáveis em relação aos embriões colhidos entre os dois tratamentos.

TABELA 3 - NÚMERO DE EMBRIÕES COLHIDOS, VIÁVEIS E PERCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS PELO NÚMERO DE EMBRIÕES COLHIDOS EM OVELHAS SUFFOLK TRATADAS COM FSH E PMSG FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA - PINHAIS (Pr) - NOVEMBRO 1998

Tratamentos	n	$\bar{X} \pm s$		Nº de emb. Viáveis /
		Embriões colhidos	Embriões viáveis	nº de emb. colhidos (%)
FSH	7	5,4 <sup>a</sup> ± 4,7	4,1 <sup>a</sup> ± 4,1	67,4 <sup>c</sup>
PMSG	7	1,6 <sup>b</sup> ± 1,6	1,0 <sup>b</sup> ± 1,9	63,6 <sup>c</sup>

<sup>abc</sup> Médias da mesma coluna seguidas de letras diferentes diferiram significativamente ( $P < 0,05$ )

A quantidade de embriões colhidos e embriões viáveis por ovelha superovulada estão representados nas Figuras 4 e 5; e os resultados relativos ao desenvolvimento embrionário e à qualidade dos embriões estão representados na Tabela 4.

TABELA 4 - MÉDIAS E PERCENTAGEM DOS EMBRIÕES COLHIDOS QUANTO AO GRAU DE DESENVOLVIMENTO EM OVELHAS SUFFOLK TRATADAS COM FSH E PMSG FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA - PINHAIS (Pr) - NOVEMBRO 1998

Tratam.	$\bar{X} \pm s$ (%)			
	Mórulas	Blastocistos	Degenerados/Atrasados	Infertilizados
FSH	2,86 ± 3,89 (46,5)	1,29 ± 2,63 (20,9)	1,14 ± 0,69 (18,6)	0,86 ± 2,27 (14,0)
PMSG	0,71 ± 1,89 (45,4)	0,29 ± 0,76 (18,2)	0,29 ± 0,49 (18,2)	0,29 ± 0,49 (18,2)

Apesar dos números tenderem a ser maiores em favor do tratamento com FSH não houve diferença significativa entre os dois tratamentos ( $P > 0,05$ ), assim como quando comparou-se o número de mórulas com o número de blastocistos dentro do mesmo tratamento.

Os níveis de progesterona no plasma determinados estão demonstrados na Tabela 5, sendo os resultados entre os dois tratamentos similares estatisticamente ( $P>0,01$ ).

TABELA 5 - NÍVEIS DE P<sub>4</sub> PLASMÁTICA (ng/ml) EM DOADORAS OVINAS DA RAÇA SUFFOLK MENSURADOS ANTES (dia 0), DURANTE O PERÍODO DE PERMANÊNCIA DO IMPLANTE DE PROGESTERONA (dia 10) E NO DIA DA COLETA DE EMBRIÕES (dia 19) – PINHAIS (PR) – NOVEMBRO 1998

Tratam.	n	X ± s		
		Dia 0	Dia 10	Dia 19
FSH	7	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	19,0 ± 8,8 <sup>b</sup>
PMSG	7	0,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	15,0 ± 5,8 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Médias seguidas de letras diferentes diferiram significativamente ( $P<0,01$ )

Houve correlação positiva do nível de progesterona plasmática no dia da coleta com o número de ovulações, tanto nas ovelhas tratadas com FSH ( $r=0,83$ ) como nas tratadas com PMSG ( $r=0,74$ ) (Fig. 6 e 7).

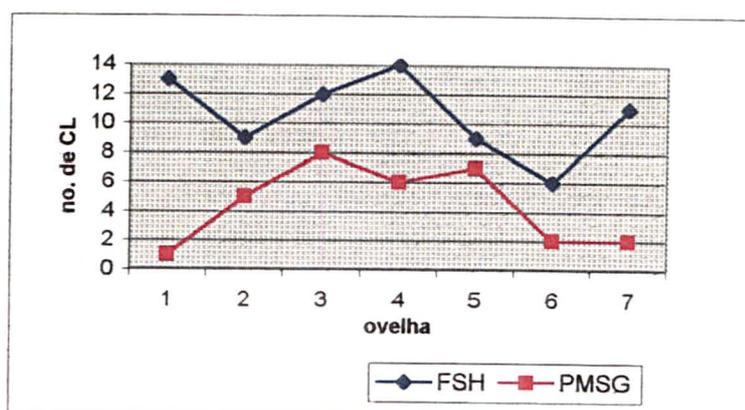


FIGURA 3 - Número de corpos lúteos (CL) observados em cada ovelha nos tratamentos com FSH e PMSG.

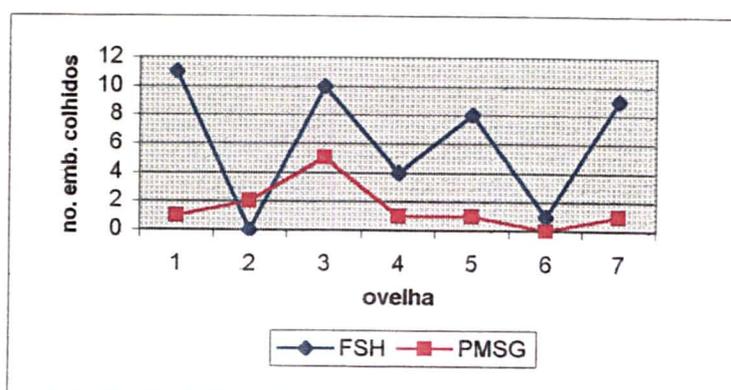


FIGURA 4 - Número de embriões colhidos de cada ovelha nos tratamentos com FSH e PMSG.

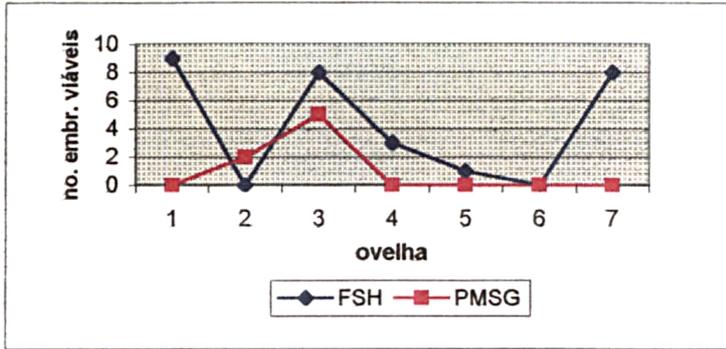


FIGURA 5 - Número de embriões viáveis colhidos de cada ovelha nos tratamentos com FSH e PMSG.

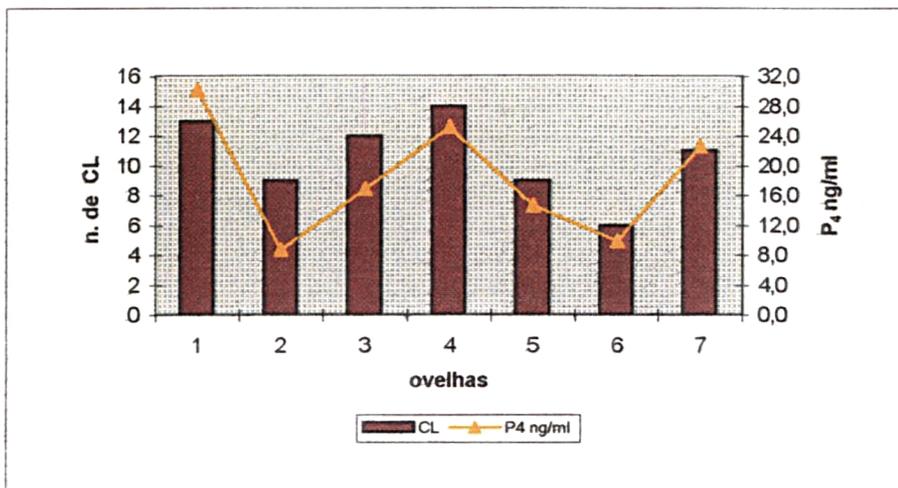


FIGURA 6 - Comparação do nível de progesterona plasmática (P4) no dia da coleta com o número de ovulações (CL) de ovelhas superovuladas com FSH ( $r=0,83$ )

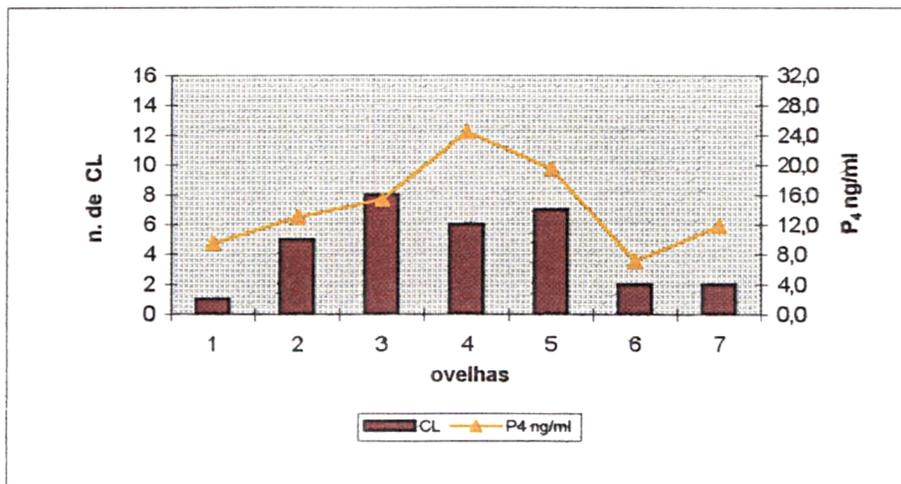


FIGURA 7 - Comparação do nível de progesterona plasmática (P4) no dia da coleta com o número de ovulações (CL) de ovelhas superovuladas com PMSG ( $r=0,74$ )

## 5. Discussão

Os resultados deste experimento demonstraram que ovelhas Suffolk podem ser superovuladas com FSH e PMSG na primavera (período de anestro sazonal no hemisfério sul), utilizando-se implante com progestágeno para sincronização do estro. Da mesma forma, HAMRA *et al.* (1986) e TORRES *et al.* (1987), afirmaram que o uso de progestágenos e a estimulação da ovulação com gonadotrofinas têm permitido a superovulação de doadoras e a sincronização do ciclo durante o anestro.

LEYVA *et al.* (1998a), mostraram que a pré-exposição à progesterona aumentou a taxa de ovulação por aumentar o número de folículos que responderam ao tratamento com PMSG; ou seja, a necessidade de um período mais longo para recrutamento de folículos ovulatórios em ovelhas tratadas somente com PMSG, resultou em reduzida taxa de ovulação comparada com aquelas que receberam progestágenos mais PMSG.

SCARAMUZZI *et al.* (1993), sugerem que a taxa de ovulação é controlada pelo recrutamento de limitado número de folículos gonadotrofina dependentes com aumento na exigência de FSH. Quando a ovulação é induzida no anestro em ovelhas, somente o crescimento de folículos antrais que estão presentes no momento da administração de gonadotrofinas exógenas podem responder com ovulação (McNEILLY *et al.* 1991). Estes resultados mostram a importância da progesterona ou seus análogos no recrutamento folicular e na subsequente resposta à gonadotrofina exógena. Isso foi confirmado por THOMPSON *et al.* (1990) e THOMPSON *et al.* (1992), quando utilizaram dois CIDR's em ovelhas tratadas

com FSHp e obtiveram aumento na taxa de ovulação comparado com aquelas fêmeas que receberam apenas um CIDR.

No presente trabalho observou-se que 100% das fêmeas que receberam o FSH apresentaram 5 ou mais corpos lúteos contra 57% das que receberam PMSG. Este resultado em prol do FSH é corroborado pelos trabalhos de ROBINSON *et al.* (1989) e SCUDAMORE *et al.* (1991).

A superovulação utilizando-se o FSH proporcionou médias superiores quanto ao número de ovulações, embriões colhidos e embriões viáveis do que o tratamento com PMSG (Tabela 3).

O número total de ovulações obtido por SCUDAMORE *et al.* (1991) e SAMARTZI *et al.* (1995), em fêmeas superovuladas com PMSG foi de 5,2 e 5,9, respectivamente, pouco acima da média obtida nesse experimento (4,4). Em fêmeas tratadas com FSH, COGNIE *et al.* (1985), SEBASTIAN *et al.* (1990) e SCUDAMORE *et al.* (1991) encontraram para o número de ovulações médias de 10,1 , 8,7 e 7,6 respectivamente, próximas da encontrada no presente trabalho (10,6). Por sua vez ROBINSON *et al.* (1989) encontraram médias superiores tanto para o tratamento com FSH (14,2) como para o PMSG (8,9).

ARMSTRONG e EVANS (1983) utilizaram para superovulação a PMSG (1500 – 2000 UI) em ovelhas Suffolk obtendo médias superiores (7,7 e 3,5) às observadas no presente experimento (4,4 e 1,6) no tocante ao número de ovulações e embriões coletados, respectivamente, provavelmente em função da utilização de dose menor (1000 UI). Porém, na superovulação com FSH nossos dados mostraram-se levemente superiores (10,6 e 5,4) aos dos autores supracitados (8,4 e 5,3) levando-se em consideração as mesmas variáveis. Fato interessante foi que utilizamos dose de FSH relativamente menor (250 UI – equivalente a 16 mg) à desses autores (20 –

24 mg) com melhores resultados. Talvez, menores doses de FSH poderiam sinalizar resultados iguais ou melhores que doses mais elevadas, dentro do limite de 16 – 24 mg.

A utilização de PMSG proporcionou número inferior de embriões colhidos em relação ao FSH, e apenas 28,8% das fêmeas superovuladas com PMSG produziram embriões viáveis contra 71,4% daquelas superovuladas com FSH. Este resultado é confirmado por ARMSTRONG e EVANS (1983), os quais observaram que a variação na taxa de ovulação tendeu a ser maior na resposta ao PMSG do que ao FSH, e uma menor percentagem de doadoras tratadas com PMSG produziram embriões aptos à transferência do que aquelas tratadas com FSH (55% e 100%, respectivamente).

Diferentes efeitos do PMSG nos folículos pré-ovulatórios contribuem para a variação da taxa de ovulação. Pode-se afirmar que o PMSG afeta profundamente o eixo hipotálamo-hipófise e os mecanismos de regulação intraovariana devido a sua longa meia-vida e sua atividade como LH e FSH (BEVERS *et al.* 1989).

Com a utilização da PMSG, não raramente, têm-se observado falhas na ovulação ou baixas respostas ovulatórias. O FSH tem apresentado respostas mais eficientes e constantes, sem os inconvenientes da PMSG (longa meia-vida) devido, provavelmente à sua ação mais específica, embora necessite ser administrada várias vezes. Além disso, a PMSG está associado à prematura regressão do corpo lúteo, resultando num encurtamento do ciclo seguinte e/ou mortalidade embrionária (SHELTON e MOORE, 1967; MOORE *et al.* 1985; BONDURANT, 1986).

A taxa de fertilização embrionária obtida nesse experimento (86,0% com FSH e 81,8% com PMSG - Tabela 2) foi maior do que nos experimentos de SAMARTZI *et al.* (1995), (68,2%) - de BOLAND e GORDON (1978), (69%), os quais também

utilizaram a monta natural. Mas, foi menor quando comparada com aquela obtida por inseminação intrauterina – 91,5% (BOLAND e GORDON, 1978). No entanto, para estes últimos autores, a recuperação de embriões foi menor quando se utilizou a inseminação intra-uterina (44,5% para monta natural contra 60,8% para inseminação).

As taxas de recuperação de embriões em ambos os tratamentos foram similares as de outros estudos (ARMSTRONG e EVANS, 1983; TORRES *et al.* 1987) e inferiores as encontradas por SMITH e MURPHY (1987) (65%) e por SAMARTZI *et al.* (1995) em fêmeas superovuladas com PMSG (52%). MOORE (1982) conseguiu taxa de recuperação de 80% quando realizou a lavagem retrógrada dos cornos uterinos e ovidutos, mas este método causava alta incidência de aderências (SMITH e MURPHY, 1987)

A percentagem de embriões recuperados de animais superovulados varia de 40 a 80% da quantidade de corpos lúteos (HAFEZ *et al.* 1980).

O baixo índice de recuperação observado em vários experimentos com ovinos pode ter diversas causas como: os oócitos podem não ser captados pelas fimbrias em razão do ovário estar superovulado e bastante aumentado; pode ocorrer transporte acelerado através do trato reprodutivo (WILMUT *et al.* 1985); ou a formação de corpo lúteo sem ovulação resultante de níveis alterados de esteróides; alterações na composição do oviduto e/ou na secreção uterina podem modificar os padrões hormonais resultando em ambiente uterino hostil ao embrião vulnerável; pode haver rápida desintegração de óvulos fertilizados e/ou embriões degenerados no período entre a ovulação e a coleta de embriões; e ainda, falhas na técnica de coleta utilizada para recuperar todos os zigotos presentes

(ARMSTRONG e EVANS, 1983; MOOR *et al.* 1985; WILMUT *et al.* 1985; SAMARTZI *et al.* 1995).

Recentes pesquisas sugerem melhoras na taxa de coleta com a utilização da semi-laparoscopia (BARI *et al.* 2000).

As médias do número de embriões colhidos e número de embriões viáveis obtidos neste experimento para fêmeas que receberam PMSG (1,6 e 1,0) foram semelhantes às aquelas encontradas por SAMARTZI *et al.* (1995) (1,8 e 1,5) quando trabalharam com ovinos da raça Chios. Nas fêmeas superovuladas com FSH, as quantidades de embriões colhidos e viáveis (5,4 e 4,1, respectivamente) foram superiores às observadas por SEBASTIAN *et al.* (1990) (4,6 e 2,4).

Com referência à percentagem de embriões viáveis em relação ao número de embriões colhidos em ovelhas superovuladas com FSH obteve-se 67,4%, pouco inferior que as médias relatadas por ARMSTRONG e EVANS (1983) (76,8%) e por TORRES *et al.* (1987) em ovelhas Pré-alpinas (73%) e ovelhas Lacaune (74,5%); porém maior que a média relatada por WALKER *et al.* (1989) que foi de 57,1%.

A percentagem de embriões viáveis em relação ao número de embriões colhidos dos dois tratamentos não diferiu estatisticamente, indicando que o PMSG não interferiu na qualidade dos embriões.

Relativamente à média do número de embriões viáveis (mórulas e blastocistos) coletados nessa pesquisa foi semelhante aos resultados encontrados por ARMSTRONG e EVANS (1983) e MAURER (1988) em ovelhas Suffolk. Mas foi menor quando comparado com outras raças conforme experimentos de TORRES *et al.* (1987) e BUCKRELL *et al.* (1989).

A produção de embriões viáveis após a superovulação é altamente variável, e quando se recuperam embriões retardados ou anormais, é difícil determinar se o

defeito primário ocorreu antes ou após o momento da ovulação (MILLER e ARMSTRONG, 1982).

Os níveis de progesterona ( $P_4$ ) em ovelhas tratadas com implantes de progestágenos aumentam rapidamente (pico de 1,5 – 2,0 ng/ml) no 4º e 5º dia para decrescer gradualmente em seguida (CUNNINGHAM *et al.* 1975). Altos níveis de progesterona no momento da retirada do progestágeno acarretam atraso da onda pré-ovulatória de gonadotrofina (HAMRA *et al.* 1986). Esta variação não foi observada em nosso experimento, porque o “kit” comercial utilizado é, segundo o fabricante, específico para progesterona e não tem reação cruzada com o progestágeno sintético aqui utilizado (Norgestomet). Essa observação vem confirmar relatos de LEYVA *et al.* (1998a) os quais utilizaram o mesmo teste para  $P_4$ , detectando aumento nos níveis de progesterona somente após a ovulação (>1 ng/ml); durante a permanência do progestágeno os níveis de  $P_4$  se mantiveram próximos a zero. Em ovelhas Sulffolk que ciclaram normalmente, LEYVA *et al.* (1998b) detectaram a  $P_4$  endógena e verificaram que ela aumentou no dia seguinte à ovulação (0,8 ng/ml); e nos dias 6 e 7 a concentração de  $P_4$  encontrava-se em torno de 7,6 ng/ml mantendo-se assim até o dia 10. Em seguida declinou pronunciadamente até o dia 14 do ciclo estral, quando o nível de  $P_4$  era o mesmo do dia da ovulação (dia 0).

Em fêmeas ciclando, o aumento do intervalo entre a luteólise e o momento da onda pré-ovulatória de gonadotrofina está associado a maiores taxas de ovulação, possivelmente por proporcionar maior tempo para os folículos atingirem o desenvolvimento pré-ovulatório (BINDON *et al.* 1979).

Neste estudo, no décimo dia após a colocação do implante, os níveis de progesterona se encontravam próximos aos valores basais detectados no dia 0 do

tratamento (<1 ng/ml), provavelmente decorrente do período de estacionalidade estral.

Estes níveis baixos de P<sub>4</sub> são mantidos durante a permanência do progestágeno, porque, segundo LEYVA *et al.* (1998a), há prorrogação do tempo de ovulação, atrasando o surgimento do pico de LH e com isso, há mais tempo para atuação das gonadotrofinas no recrutamento e desenvolvimento folicular.

No momento da coleta (dia 19 do tratamento) foi encontrado valores de P<sub>4</sub> a partir de 7,3 até 32,7 ng/ml. O aumento no nível de progesterona foi correlacionado com o aumento no número de ovulações e embriões colhidos. Segundo EVANS e ROBINSON (1980), a quantidade de progesterona depende do número de corpos lúteos formados. E LEYVA *et al.* (1998b) encontraram correlação positiva entre o diâmetro do corpo lúteo e concentração de progesterona plasmática. Conforme os resultados apresentados na Figura 6, e em concordância com EVANS e ROBINSON (1980), pode-se sugerir que com altos níveis de progesterona no dia da coleta, há grande probabilidade de se ter maior número de corpos lúteos.

## 6. Conclusão

O presente experimento nas condições em que foi conduzido permite concluir que:

- a utilização de FSH para superovulação demonstrou ser significativamente superior ao PMSG quanto a:
  - taxa de ovulação,
  - taxa de recuperação de embriões e;
  - número de embriões viáveis.
- o FSH demonstrou ser a gonadotrofina de escolha entre os dois tratamentos superovulatórios em ovelhas Suffolk durante o anestro sazonal.

## 7. Referências Bibliográficas:

- AKINLOSOTU, B.A.; WILDER, C.D. Fertility and blood progesterone levels following LHRH-induced superovulation in FSH-treated anestrous goats. *Theriogenology*, v. 40(1), p. 895-904, 1993.
- ALABART, J.L.; FOLCH, J.; FERNÁNDEZ-ARIAS, A.; *et al.* Screening of some variables influencing the results of transfer in the ewe. I. five-day-old embryos. *Theriogenology*, v. 44, p. 1011-1026, 1995.
- ALLISON, A.J.; ROBINSON, T.J. The effect of dose level of intravaginal progestagen on sperm transport, fertilization and lambing in the cyclic Merino ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 22, p. 515-531, 1970.
- ANDERSON, G.B. Fertilización, desarrollo inicial y transplante embrionario. In: *Reproducción de los Animales Domésticos*, editado por H.H. Cole e P.T. Cupps, ed. Acribia, Zaragoza, p. 241-262, 1984.
- ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats, *Theriogenology*, v. 19, p. 31, 1983.
- ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v. 39, p. 7-24, 1993.
- BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; *et al.* Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. *Theriogenology*, v. 53, p. 727-742, 2000.
- BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Pharmacological manipulation of the estrus cycle to improve artificial insemination or embryos transfer programs. XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões - Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 1, supl. 26, p. 179-198, 1998.
- BASIOUNI, G.F.; KHALID, M.; HARESIGN, W. Effect of bovine follicular fluid treatment and progesterone priming on luteal function in GnRH – treated seasonally anoestrous ewes. *Animal Science*, v.62, p. 443-450, 1996.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN TOL, H.T.M.; *et al.* Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 745-754, 1989.
- BINDON, B.M.; BLANC, M.R.; PELLETIER, J.; *et al.* Periovarian gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 55, p.15-25, 1979.
- BOLAND, M.P.; GORDON, M.A. Recovery and fertilization of eggs following natural service insemination in galway ewe. *Irish Veterinary Journal*, July, p.123-125, 1978.
- BONDURANT, R.H. Embryo transfer in sheep and goats. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*. (s.l.), W.B. Saunders, v. 2, p. 63-66, 1986.
- BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; *et al.* FSH Bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, v. 49, p. 1031-1037, 1998.

- BROWN, M.A.; JACKSON, W.G. Ewe productivity and subsequent preweaning lamb performance in St. Croix sheep bred at different times during the year. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 1258-1263, 1995.
- BUCKRELL, B.C.; GARTLEY, C.J.; JOHNSON W.H. Results of commercial sheep embryo transfer program. *Theriogenology*. v. 31(1), p. 178, 1989.
- BUNCH, T.D.; PANTER, K.E.; WANG, S.; *et al.* The effects of three dosing regimens of gonadotrophins on sheep superovulation. *Theriogenology*, v. 53, p. 494, 2000.
- BUTLER, J.E.; HAMILTON, W.C.; SASSER, R.G.; *et al.* Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biology of Reproduction* v. 26, p. 925-933, 1982.
- CAMPARA, L. Comparacion de los resultados obtenidos com una o dos dosis diarias de 4 diferentes gonadotrofinas. In: **VI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE)**, Curitiba – Pr, p. 65-68, 1991.
- CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; *et al.* *Reproductive Physiology Station*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Monnaie, France, 1989.
- CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Different effect of LH on FSH – induced superovulation in two breeds of cattle. *Theriogenology*, v. 23, p. 184, abstr., 1985.
- COONROD, S.A.; COREN, B.R.; McBRIDE, B.L.; *et al.* Successful non-surgical collection of ovine embryos. *Theriogenology*, v. 25, p. 149, 1986.
- CRIGHTON, D.B.; FOSTER, J.P.; HARESIGN, W.; *et al.* Plasma LH and progesterone level after single or multiple injections of synthetic LH-RH in anestrus ewes and comparison with levels during the estrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 44, p. 121-124, 1975.
- CUNNINGHAM, N.F.; SABA, N.; MILLAR, P.G. Release of progesterone from silicone rubber implants on plasma progesterone levels in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 43, p. 555-558, 1980.
- DE THIMONIER, R.; PELLETIER, P. *Biology Animal, Biochemistry and Biophysics* v. 11, p. 559, 1971.
- DRAIN COURT, M.A.; CAHILL, L.P. Preovulatory follicular events in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 71, p. 205-211, 1984.
- ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D.; SEIDEL, G.E. Superovulating cows with follicle-stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology*, v. 9, p. 17, 1978.
- EVANS, G.; ROBINSON, T.J. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen – PMSG treatment in the breeding and anestrus. *Journal Agriculture Science*, Camb., v. 94, p. 69-88, 1980.
- EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatment. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, p. 47-53, 1984.
- EVANS, G.; JABBOUR, N.H.; MOORE, N.W.; Time of intrauterine insemination of superovulatory ewe using fresh and frozen semen. In: *Annual Conference of Australian Society of Reproduction and Biology*, Queensland, 3, set. 1986. *Anais ... Queensland, Aust. Soc. Reprod. Biology*, v. 18, p.18, 1986.

- FOSTER, D.L.; RAYAN, K.D. Endocrine mechanisms governing transmittion into adulthood in female sheep. *In: Reproductive Endocrinology of Domestic Ruminants*. R.J. Scaramuzzi, D.W. Lincoln and B.J. Weir (eds.). *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 30, 75-90, 1981.
- GOODMAN, R.L.; BITTMAN, E.L.; FOSTER, D.L.; *et al.* Alternations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biology and Reproduction*, v. 27, p. 580-589, 1982.
- GRANER, E.A. *Estatística*, ed. Melhoramentos, S. Paulo, 1966.
- GREENWALD, G.S.; TERRANOVA, P.F. Follicular selection and its control. *In: Knobil, E.; Neill, j. (eds), The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd, p. 387-445, 1989.
- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, v. 37, p. 269-275, 1992.
- HAIGH, J.C.; DALTON, W.J.; RUDER, C.A.; *et al.* Diagnosis of pregnancy in moose using a bovine assay for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology*, v.40, p. 904-907, 1993.
- HAFEZ, E.S.E.; LEVASSEUR, M.C.; THIBAULT, C. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. *In: Reproduction in Farm Animals*, ed. E.S.E. Hafez, Philadelphia, 1980.
- HAMRA, A.H.; MASSRI, Y.G.; MARCEK, J.M.; *et al.* Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-contrlled internal drug-release dispensers, implants and sponges. *Animal Reproduction Science*, v. 11, p. 187-194, 1986.
- HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of estrous cycle. *Journal of Animal Science*, v. 57 (Suppl. 2), p. 404-424, 1983.
- HARESIN, W.; PETERS, A.R.; STAPLES, L.D. The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Animal Production*, v. 50, p. 111-121, 1990.
- HARESIN, W.; BASIOUNI, G.F.; KHALID, M. Effect of progesterone priming on gonadotrophin secretion and luteal function in GnRH-treated seasonally anoestrus ewes. *Animal Science*, v.62, p. 97-103, 1996.
- HUNTER, M.G.; SOUTHEE, J.A.; McLEOD, B.J.; *et al.* Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRh-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anestrus ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 76, p. 349-363, 1986.
- JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. *In: Reprodução Animal*, editado por E.S.E. Hafez, p. 217-240, 1995.
- KARSCH, F.J.; LEGAN, S.J.; HAUGER, R.L.; *et al.* Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: dependence on the ovaries. *Endocrinology*, v. 101, p. 800-806, 1977.
- LEGAN, S.J.; KARSCH, F.J. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biology and Reproduction*, v. 23, p. 1061-1068, 1980.

- LEGAN, S.J.; l'ANSON, H.; FITZGERALD, B.P.; *et al.* Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycles in anestrus ewes. *Endocrinology*, v. 117, p. 1530-1536, 1985.
- LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrus ewes. *Theriogenology*, v. 50, p. 377-393, 1998a.
- LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, v. 50, p. 395-416, 1998b.
- LINDSELL, C.E.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-p at different stages of estrous cycle. *Theriogenology*, v. 26, p. 209-219, 1986.
- LYNCH, J.J.; HINCH, G.N.; ADAMS, D.B. *The Behavior of Sheep*. ed. CAB international e Csiro. Austrália, 1992.
- MAPLETOFT, R.J. The tecnology of embryo transfer. In: World Veterinary Congress, 33, Montreal, Proceedings... Montreal, *International Embryo Transfer Society*, p. 10-11, 1987.
- MARAI, I.F.M.; OWEN, J.B. *Nuevas técnicas de producción ovina*, ed. Acribia, Zaragoza, 1994.
- MARTIN, G.B.; OLDHAM, C.M.; COGNIÉ, Y.; PEARCE, D.T. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams – a review. *Livestock Production Science*, v.15, p. 219-247, 1986.
- MATTON, P.; BHERER, J.; DUFOUR, J.J. Morphology and reponsiveness of the two largest ovarian follicles in anestrus ewe. *Journal of Animal Science*, v. 57, p. 459-464, 1977.
- MAURER, R.R. Superovulation with FSH in Dorset and Suffolk ewes. In: *Internatinal Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 11, Dublin, Proceedings... Dublin, 1988. p.174, 1988.
- MAXWELL, W.M.C.; RYAN, J.P.; HUNTON, J.R. Effect of ovarian response on distribution of ovulations in superovulated Merino ewes. *Proceedings... Australian Society for Reproductive Biology*, v.18, p. 21, 1986.
- McKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J. Collection of embryo from ewes by laparoscopy. *Veterinarian Records*, v. 115, p. 158, 1984.
- McKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; *et al.* Repeat recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*, v. 25, p. 855-65, 1986.
- McLEOD, B.J.; HARESING, W. Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 71, p. 381-386, 1984.
- McNEILLY, A.S.; JONASSEN, J.A.; FRASER, H.M. Supression of follicular development after chronic LHRH immunoneutralization in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 76, p. 481-490, 1986.

- McNEILLY, A.S.; PICTON, H.M.; CAMPBELL, B.K.; *et al.* Gonadotropic control of follicle growth in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 23 (Supl.), p. 177-186, 1991.
- MILLER, B.G.; ARMSTRONG, D.T. Infertility in superovulated immature rats: role of ovarian steroid hypersecretion. *Biology and Reproduction* v. 26, p. 861-868, 1982.
- MOORE, N.W. Embryo transfer in sheep: treatment and preparation of donors. In: *Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats*, Canberra, may 1981. Proceedings... Australian Society for Reproductive Biology, p. 35-37, 1982.
- MURRAY, J.F.; DOWNING, J.A.; SCARAMUZZI, R.J.; *et al.* Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. *Theriogenology*, v. 42, p. 1337-1347, 1994.
- NEVES, J.P. Transferência de embriões em ovinos. *Theriogenology*, v. 31, p. 721-730, 1989.
- NOEL, B.; BISTER, J.L.; PIERQUIN, B.; *et al.* Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology*, v. 41, p. 719-727, 1994.
- NOWAK, R.; RAJKUMAR, R.R.; WEBLEY, G.E.; *et al.* Effect of prolonged exposure to exogenous melatonin on onset and end of the breeding season and on the growth rate of ewe lamb. *British Veterinary Journal*, v. 146, p. 17-23, 1990.
- NUGENT III, R.A.; NOTTER, D.R.; BEAL, W.E. Effects of ewe breed and ram exposure on oestrus behavior in may and june. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 1363-1370, 1988.
- PEARCE, D.T.; OLDHAM, C.M.; GRAY, S.J. Progestagens, PMSG and the ram effect after artificial insemination in spring to synchronise non-pregnant ewes. *Journal of Animal Science*, v.10, p.117-123, 1986.
- PEMBERTON, D.H. Embyo transfer in goats. In: *Artificial Breeding in Sheep and Goats*. Sydney, Ed. Univ. Sydney. Course for Veterinarians v. 96, p.7-23, 1987.
- REEVES, J.J. Endocrinology of reproduction. In *Reproduction in Farm Animals* 5<sup>th</sup> ed. E.S.E. Hafez, Philadelphia, Lea & Febiger, 1986.
- ROBERTSON, H.A. La reproducción en las ovejas y en las cabras. In: *Reproduccion de los animales domesticos*, editado por H.H. Cole e P.T. Cupps; ed. Acribia, Zaragoza, p.407-425, 1984.
- ROBINSON, J.J. Controlled breeding of sheep and goats. In: *Sheep Breeders Cong.* (Muresk), editado por G.L. Tomes, D.E. Robertson e R.J. Lightfoot, Institute of Technology, W. Australia, p. 423-437, 1976.
- ROBINSON, J.J.; WALLACE, J.M.; AITKEN, R.P. Fertilization and ovum recovery rates in superovulated ewes following cervical insemination or laparoscopic intra-uterine insemination at different times after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns. *Journal of Reproduction and Fertility* v. 87, p. 771-782, 1989.
- RODRIGUES, J.L. Perspectivas da biotecnologia na reprodução animal. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, ano 2, n. 07, 1996.

- RUTTLE, J.; LUCERO, S.; KEY, S.; *et al.* Ovine estrus synchronization and superovulation using Norgestomet B and FSH-pituitary. *Theriogenology*, v. 30, p. 421-427, 1988.
- SAMARTZI, F.; BOSCO, C.; VAINAS, E.; *et al.* Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn. *Animal Reproduction Science*, v. 39, p. 215-222, 1995.
- SCARAMUZZI R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; *et al.* A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 459-478, 1993.
- SCUDAMORE, C.L.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; *et al.* Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes. *Theriogenology*, v. 35, p. 330-337, 1991.
- SCUDAMORE, C.L.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; *et al.* The effect of different levels of progestagen priming on the quality of embryos recovered from superovulated ewes. In: *Progress in Sheep and Goat Research*, editado por A. W. Speedy, C.A.B. International, p. 17, 1992
- SEBASTIAN, A.L.; COGNIE, Y.; COCERO, M.J.; *et al.* Effect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. *Theriogenology*, v. 34(1), p. 175-180, 1990.
- SEBASTIAN, A.L.; INSKEEP, E.K. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. *Livestock Production Science*, v. 27, p. 177-184, 1991.
- SIQUEIRA, E.R. Raças ovinas e sistemas de produção. In: *Produção de Ovinos*. Anais. Jaboticabal, FUNEP, p.1-25, 1990.
- SHORT, R.V. Role of hormones in sex cycles. In: *Hormones in reproduction*, editado por C. R. Austin e R.V. Short, p. 42-72. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
- SMITH, C.J.; MURPHY, C.A. An antegrade surgical uterine flush technique for ova collection in the ewe. *American Journal Veterinary Research*, v. 48(7), p. 1129-1131, 1987.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 3<sup>a</sup> ed., IETS, Savoy - Illinois, p. 112-113, 1998.
- THOMPSON, J.G.E.; SIMPSON, R.W.; JAMES, R.W.; *et al.* The application of progesterone-containing CiDR<sup>TM</sup> devices to superovulated ewes. *Theriogenology*, v. 33, p. 1297-1304, 1990.
- THOMPSON, J.G.E.; SIMPSON, A.C.; JAMES, R.W.; *et al.* Timing of the LH peak and ovulations in superovulated Coopworth ewes synchronised with progesterone-containing CIDR<sup>R</sup> devices. *Proceedings New Zealand Animal Production Society*, p. 171-174, 1992.
- TORRES, S.; COGNIE, Y.; COLAS, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*, v. 28(2), p.407-419, 1987.
- ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY, A.R.J. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocrinology Review*, v. 16, p. 765-787, 1995.

- VALLET, J.L.; LAMMING, G.E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and estradiol in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 90, p. 625-634, 1990.
- WALLACE, J.M. Artificial insemination and embryo transfer. In: *Progress in Sheep and Goat Research*, editado por A. W. Speedy, C.A.B. International, p. 1-24, 1992.
- WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; FRENHAM, A. *et al.* The use of synthetic gonadotrophin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology*, v. 31(4), p. 741-752, 1989.
- WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; SEAMARK, R.F.; *et al.* Variation in the timing of multiple ovulations following gonadotrophin releasing hormone treatment its relevance to collectins pronuclear embryos of sheep. *Theriogenology*, v. 28, p. 129-137, 1987.
- WILMUT, I; HUME, A. The value of embryo transfer to cattle breeding in Britain. *Veterinary Record*, v. 103, p. 107-110, 1978.
- WILMUT, I; SALES, D.I.; ASHWORTH, C.J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology*, v. 23, p. 107-119, 1985.
- WILMUT, I. Transferencia de embriones, In: *Nuevas Técnicas de Producción Ovina*, editado por MARAI, I.F.M. & OWEN, J.B. Zaragoza, ed.Acribia, p.89-99, 1994.