UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DO PICO PRÉ-OVULATÓRIO DE LH EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS SUPERESTIMULADAS NOS PERÍODOS DE CICLICIDADE, TRANSIÇÃO E ANESTRO

Carla Cristina D'Amato Rossi
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DO PICO PRÉ-OVULATÓRIO DE LH EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS SUPERESTIMULADAS NOS PERÍODOS DE CICLICIDADE, TRANSIÇÃO E ANESTRO

Carla Cristina D'Amato Rossi
Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia
Co-orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2012

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLA CRISTINA D'AMATO ROSSI – Filha de Antonio D'Amato e Sandra Aparecida Zoccolaro, irmã de Caroline Cristina D'Amato, esposa de Mauricio Andreotto Rossi, e mãe de Bianca D'Amato Rossi, nascida em 30 de abril de 1986, na cidade de Jaboticabal, São Paulo. É Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário Barão de Mauá em 12 de Dezembro de 2009 na cidade de Ribeirão Preto. Em março de 2010 ingressou no mestrado pelo programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária na área de Reprodução Animal, da faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Jaboticabal – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, com auxílio da bolsa CAPES.

Dedico,

À Deus por me guiar e me mostrar o caminho nas horas difíceis, aos meus pais e minha irmã que sempre estiveram do meu lado na busca desse sonho e acima de tudo ao meu marido que por muitas vezes foi muito mais que um companheiro nessa jornada. E por último e não menos importante ao meu presente de Deus, minha filha Bianca, por mostrar o quanto eu sou capaz!!

Durante muito tempo eu fiquei preocupada com que os outros achavam ao meu respeito. Mas hoje, o que os outros acham de mim muito pouco me importa (a não ser que sejam pessoas que me amam), porque minha salvação não depende do que os outros acham de mim, mas o que Deus sabe ao meu respeito!

Padre Fabio de Mello

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e compreensão para seguir em frente, mesmo quando surgiram obstáculos que pareciam intransponíveis.

Aos meus Pais**, Antonio D'Amato e Sandra Aparecida Zoccolaro** pelo amor, compreensão e formação que me foi concedido, por vocês serem meu porto seguro em dias de maré alta, e por não abrirem mão dos meus sonhos. Obrigado por estarem sempre ao meu lado! AMO VOCÊS... Agradeço por sempre me mostrarem o caminho certo, mesmo que muitas vezes parecesse que era o errado, o conselho de vocês sempre foi fundamental para mim!

A minha irmã**, Caroline Cristina D'Amato**, que sempre foi minha companheira e confidente, e mesmo com a grande diferença de idade fez com que eu aprendesse grandes e importantes ensinamentos para a vida. É graças a você que também sou o que sou hoje!

Ao meu marido, companheiro e amigo**, Mauricio Andreotto Rossi**, por sempre estar presente, e nunca me desamparar nas horas difíceis, por me deixar amá-lo e ser amada, por me auxiliar nesse projeto quando muitas vezes ficava sozinha trabalhando na madrugada, e de repente, lá estava ele me fazendo companhia. Obrigada pelos conselhos, ajuda, amizade, ensinamentos e compreensão, obrigada por se preocupar comigo e ficar do meu lado nessa gravidez terrível, mas que gerou o melhor presente das nossas vidas! Enfim, obrigada por existir e ser parte da minha vida TE AMO... Do jeitinho que você é... E não importa o que os outros dizem... O importante é que Deus nos uniu e dessa união você me fez a pessoa mais feliz do mundo. Agradeço por me fazer crescer e ser uma pessoa melhor a cada dia!

A minha filha**, Bianca D'Amato Rossi**, que na hora certa veio alegrar nossas vidas e me mostrar o quanto sou corajosa e capaz, o quanto sou forte e frágil ao mesmo tempo, e me proporcionar momentos inesquecíveis! Obrigada por

me mostrar o quanto de amor eu tenho para oferecer e acima de tudo por me mostrar que quando se é mãe tudo fica mais colorido e mais gostoso de ser conquistado... Você é meu tudo, você Bianca se mostrou forte desde o início, lutou a gestação toda para se manter e hoje eu digo que sou mais forte graças a você minha filha, você me mostrou esse caminho. Felicidade maior não há, te amo incondicionalmente, obrigada por estar em nossas vidas!

Aos meus tios, avós, primos, sogra e demais parentes e agregados, por sempre estarem presente, por sempre estarmos unidos! Em especial aos meus avôs que se foram, e não puderam presenciar mais essa conquista, mas com certeza sempre irá estar em nossas preces. Amo vocês!!

Ao Professor **Joaquim Mansano Garcia,** por confiar em mim e me receber na hora que mais precisei, entendendo minhas dificuldade e limitações, não tenho palavras para agradecê-lo, obrigada pela confiança!!!

À Professora **Flavia Lopes Arnold**, pela GRANDE ajuda, experiência cedida e conselhos dados, pela paciência e amizade. E pelo espaço cedido no Freezer do departamento. Meu muito obrigada por tudo.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – através da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária por realizar um mestrado de nível reconhecido em todo o país.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À amiga e companheira **Dra. Maria Emilia Franco Oliveira,** pela ajuda, dedicação, paciência, permitindo a execução desse mestrado, que contribuiu muito para meu aprendizado.

Ao Laboratório do Professor Guilherme de Paula Nogueira, da Faculdade de Medicina Veterinária/ UNESP de Araçatuba, que contribuíram com a análise das minhas amostras. Obrigada pela atenção e ensinamento.

Ao casal de amigos **Ana Lívia Motta Silva e Rafael,** por serem amigos acima de tudo. Por estarem presentes em todos os momentos. Amo vocês. E a

Todos os meus outros amigo, **Ana Carolina Duarte Moreira, Danielle silva, Juliana Rosa, Guilherme Rosa, Mirian Carla Vernilho, Fabiana Titara e Hugo.**

A todos os **professores da FCAV/UNESP** que tive o prazer de conviver, dividindo conhecimentos e experiências, principalmente os da Reprodução Animal. Ao Coordenador da pós-graduação em Medicina Veterinária, Professor **Jurandir Fagliari**, pelo auxílio e compreensão.

A professora e amiga **Erika Morani,** pela minha formação como profissional, por me inspirar e me auxiliar. Obrigada.

Aos queridos **colegas do Setor de Reprodução Animal** e amigos conquistados: Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida, Edson de Aguiar, Isabel Aparecida Penharol Natarelli, Ana Paula Perini, Aline Costa de Lúcio, Naiara Zoccal Saraiva, Michelly Fernandes de Macedo, Danilas Salinet de Melo, Juliana Corrêa Borges, Clara Slade Oliveira, Letícia Zocolaro de Oliveira, Flávia Lopes Arnold, Dan Arnold, Cássia Orlandi, Marina Ragnani Lima, Guilherme Fazan Rossi, Tathiane Fergurson Motheo, Bruna Mazeti, Aracélle Elisane Alves, Maricy Apparicio Ferreira, Eliandra Pires, Paula Andressa Pennacchi Savi, Janaina Torres Carreira, Pedro Paulo Maia Teixeira, Felipe Farias Barros, Diogo José Cardilli e Marcus Rossi Feliciano, obrigada pelo convívio e experiências cedidas

Aos **estagiários do CTA**, pela ajuda, risadas e trabalhos realizados, vocês contribuíram muito para que tudo pudesse se realizar!!!

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis" - Fernando pessoa.

À todos meu muito obrigada!!!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xi**

LISTA DE TABELAS ..... **xiiiiii**

LISTA DE FIGURAS ..... **xiviv**

RESUMO ..... **xv**

ABSTRACT ..... Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO DE LITERATURA **3**

2.1. Ciclo Estral **3**

2.2. Controle endócrino **4**

2.3. Fotoperíodo **7**

2.4. Dinâmica Folicular **7**

2.5. Sincronização e Indução do Estro e da Ovulação e Superestimulação . **8**

2.5.1.Prostaglandinas **9**

2.5.2. Progestágenos e Dispositivos Intravaginais **10**

2.5.3. Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) **11**

2.5.4. Hormônio folículo estimulante (FSH) **12**

2.6. Tratamentos Hormonais e o Pico de LH **12**

3. OBJETIVOS **14**

4. HIPOTESE **15**

5. MATERIAL E MÉTODOS **16**

5.1. Localização e Caracterização da Área **16**

5.2. Animais e grupos **16**

5.3. Tratamento Hormonal. **17**

5.4. Detecção do Estro **21**

5.5. Ovulação **21**

5.6. Colheitas de sangue **21**

5.7. Dosagem de LH **22**
5.8. Análise estatística **22**
6. RESULTADO **23**
6.1. Momento do estro **23**
6.2. Ovulação **24**
6.3. Momento do pico pré-ovulatório de LH **25**
6.4. Amplitude do pico pré-ovulatório de LH **26**
7. DISCUSSÃO **31**
8. CONCLUSÃO **33**
9. REFÊRENCIAS **31**

LISTA DE ABREVIATURAS

Anova	Análise de variância
CIDR	“Controlled Internal Drug Release”
CL	Corpo Lúteo
D	Dia
E_2	Estrógeno
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
FGA	Acetato de fluorogestona
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSHp	Hormônio folículo estimulante de origem suína
g	grama
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	hora
IA	Inseminação artificial
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mg	Miligramas
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embriões
ºC	Grau Celsius
P_4	Progesterona
PG	Prostaglandina
PGF2α	Prostaglandina 2α
POF	Primeira onda Folicular
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotação por minuto
SAS™	Statistical Analysis System

SNC	Sistema nervoso Central
UI	Unidade internacional
µg	Micrograma
UOF	Última onda folicular

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Grupos experimentais preconizados para tratamentos de superovulação e colheita de embriões em ovelhas da raça Santa Inês. 17

Tabela 2 - Valores médios (±S.E.M.) para o intervalo entre o final dos protocolos de superovulação (retirada do dispositivo intravaginal– CIDR) e o momento do início do estro de acordo com os grupos e períodos estacionais. 23

Tabela 3 - Índices da ovulação em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de anestro. 24

Tabela 4 - Índices da ovulação em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de Transição. 25

Tabela 5 - Índices da ovulação em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de Ciclicidade. 25

Tabela 6 - Valores médios (±S.E.M.) para o momento do pico pré-ovulatório de LH, em horas, em relação à retirada do dispositivo intravaginal –CIDR. 25

Tabela 7 - Valores médios (±S.E.M.) do intervalo entre a manifestação do estro e pico pré-ovulatório de LH em horas, em relação à retirada do dispositivo intravaginal –CIDR. 26

Tabela 8 - Valores médios (±S.E.M.) da amplitude do pico pré-ovulatório de LH em ng/ml, em horas, em relação a retirada do dispositivo intravaginal –CIDR.....30

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação da primeira onda folicular. 18

Figura 2- Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação da ultima onda folicular 20

Figura 3 – Distribuição do número de ovelhas que apresentaram o início do estro após a retirada do dispositivo intravaginal (CIDR) nos diferentes grupos e períodos estacionais. 24

Figura 4 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular no período de anestro. 27

Figura 5 – Perfil sérico de Hormonio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da ultima onda folicular no período de anestro. 27

Figura 6 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular no período de transição..... 28

Figura 7 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da ultima onda folicular no período de transição. 28

Figura 8 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular no período de ciclicidade..... 29

Figura 9 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da ultima onda folicular no período de ciclicidade. 29

AVALIAÇÃO DO PICO PRÉ-OVULATÓRIO DE LH EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS SUPERESTIMULADAS NOS PERÍODOS DE CICLICIDADE, TRANSIÇÃO E ANESTRO

RESUMO- Nos protocolos de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) diversos tratamentos têm sido testados com intuito de aumentar a eficiência desta biotécnica, dentre eles, os que visam a superestimulação iniciada próxima às emergências de ondas foliculares. No entanto, estas provocam modificações endócrinas e ovarianas, como pico de LH. O conhecimento do momento da manifestação de estro, pico de LH e ovulação, são essenciais para garantir o avanço e eficiência desta biotécnica da reprodução. O momento e a amplitude do pico pré-ovulatório de LH tem sido um dos melhores parâmetros para prever o tempo da ovulação. De acordo com esta problemática o presente estudo objetivou investigar o início do estro, o momento e amplitude do pico pré-ovulatório de LH em ovelhas submetidas a tratamentos superovulação com FSH, iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares, nos períodos de ciclicidade, transição e anestro. Para tanto foram utilizados dois protocolos hormonais para superestimulação de primeira onda e três protocolos para última onda folicular, em diferentes períodos, sendo eles, anestro, transição e ciclicidade. Todos os animais receberam um dispositivo intravaginal e administração de D-Cloprostenol no D0. As aplicações de FSHp em oito doses decrescentes começaram 48 horas antes da retirada do dispositivo intravaginal e das aplicações de eCG associado com o D-Cloprostenol. A coleta de sangue para dosagem de LH ocorreu a cada três horas e foram dosados através da técnica de radioimunoensaio, assim verificou-se o momento e amplitude do pico pré-ovulatório de LH. Os resultados mostraram que o melhor tratamento a ser realizado é a superestimulação da primeira onda folicular no momento de ciclicidade, onde obteve maior amplitude do pico pré-ovulatório de LH e melhores taxas de ovulação.

Palavra-chave: Superestimulação, protocolos hormonais; pico de LH; Ovelhas.

SUMMARY - EVALUATION OF PEAK PREOVULATORY LH OF SANTA INES SHEEP SUPERSTIMULATED CYCLICALITY PERIODS, AND TRANSITION ANESTROUS.

In the protocols of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) various treatments have been tested in order to increase the efficiency of biotech, including those aimed at overstimulation started next to follicular waves of emergencies. However, these cause endocrine ovarian and modifications as LH surge. Knowing the time of estrus, LH surge and ovulation, are essential to ensure the advancement and efficiency of biotech reproduction. The timing and amplitude of the pre-ovulatory LH surge has been one of the best parameters to predict the time of ovulation. According to this problem the present study aimed to investigate the onset of estrus, the timing and extent of the pre-ovulatory LH surge in sheep subjected to superovulation treatments with FSH, started near the emergence of the first and last follicular waves during the periods of cyclicity , transition and anoestrus. For this we used two hormonal protocols to overstimulation of the first wave and three protocols for last follicular wave in different periods, namely, anestrus, transition and cyclicality. All animals received an intravaginal device and administration of D-cloprostenol on D0. The application FSHp eight decreasing doses started 48 hours before removal of the intravaginal device and applications associated with eCG D-cloprostenol. The blood collection for LH dosage occurred every three hours and were measured by radioimmunoassay, and there was the time and amplitude of the pre-ovulatory LH surge. The results showed that the best treatment is to be performed follicular overstimulation of the first wave at the time of cyclicity, which obtained the highest amplitude of the pre-ovulatory LH surge and ovulation rates best. **Keyword:** overstimulation, hormonal protocols; LH peak; Sheep.

1. INTRODUÇÃO

Protocolos de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) em ovinos, como em outras espécies, consistem na administração de elevadas doses de gonadotrofinas que maximizam o número de embriões viáveis por ciclo (VEIGA-LOPEZ et al., 2008). Diversos tratamentos têm sido estudados para aumentar a eficiência desta biotécnica, dentre eles, os que visam a superestimulação iniciada próxima às emergências de ondas foliculares (VEIGA-LOPEZ et al., 2005; MENCHACA et al., 2007). Há relatos que tais protocolos têm mostrado melhoria na produção de embriões (COGNIÉ, 1999; MENCHACA et al., 2009).

No entanto, as aplicações destes tratamentos superovulatórios provocam modificações endócrinas e ovarianas (KAFI & McGOWAN et al., 1997), as quais são principalmente relacionadas à distúrbios do desenvolvimento folicular pré-ovulatório (ROBINSON et al., 1968) e aos eventos endócrinos como o padrão de pulsatilidade e pico do LH (BEN JEBARA et al., 1994; D'OCCHIO et al., 1999). Tais fatos interferem no processo de ovulação de modo a induzir falhas como folículos anovulatórios (BEVERS et al., 1989) e luteinizados (MONNIAUX et al., 1983), e ovulações prematuras (DRIANCOURT & FRY 1992), tardias ou até mesmo assincrônicas (COGNIÉ et al., 2003). Estes acontecimentos causam subsequentes falhas de fecundação, devido à presença de oócitos ou espermatozóides envelhecidos no momento da fecundação (JABBOUR & EVANS, 1991). Desta forma, observa-se redução na eficiência destes protocolos, relacionada ao número de embriões transferíveis (COGNIÉ et al., 2003).

Baseado no fato de que os intervalos entre a manifestação de estro, pico de LH e ovulação podem ser afetados pelos tratamentos de MOTE, o conhecimento do momento em que estes eventos ocorrem é essencial para garantir o avanço e eficiência desta biotécnica da reprodução (VEIGA-LOPEZ et al., 2008). A investigação do momento do pico pré-ovulatório de LH é um dos melhores parâmetros para prever o tempo da ovulação, pois o intervalo entre a ocorrência do pico de LH e a ovulação é bastante constante para as várias espécies domésticas (MAUREL & COMBARNOUS, 1994).

Inúmeros trabalhos determinaram o momento do pico de LH em ovinos, entretanto, diferenças foram observadas entre protocolos hormonais e raças (VEIGA-LOPEZ et al., 2008; SIMONETTI et al., 2008; SIDDIQUI et al., 2010, MONTEIRO et al., 2009).

O fotoperíodo também interfere no momento do pico pré-ovulatório de LH. O decréscimo do comprimento dos dias incrementa a atividade de pulso de GnRH (WHEELER & LAND, 1977), enquanto seu aumento diminui esta pulsatilidade (BITTMAN et al., 1985). Como consequência podem ser observadas alterações do momento e amplitude do pico pré-ovulatório de LH e redução da taxa de fecundação dos oócitos produzidos por fêmeas superestimuladas (MITCHELL et al., 2002).

De acordo com esta problemática o presente estudo objetivou investigar o momento do pico pré-ovulatório de LH em ovelhas submetidas a tratamentos superestimulatórios iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares, nos períodos de ciclicidade, transição e anestro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo Estral

A ovelha é um animal poliéstrico estacional. Assim sua atividade reprodutiva pode ser dividida em estações de anestro, acasalamento e de transição. Isso ocorre de acordo com a localização geográfica em relação aos trópicos, sendo ainda considerada fotossensível. Ou seja, a estação de reprodução ocorre durante o período do ano de dias com número decrescente de horas luz. À medida que se aproxima da Linha do Equador, esta estacionalidade é diminuída ou inexistente. A ciclicidade também é fortemente influenciada pelo fator raça e algumas raças brasileiras apresentam atividade reprodutiva durante todo o ano, independente de localização geográfica (FONSECA, 2005; MORAES et al., 2008)

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários. Nas ovelhas, o ciclo estral tem uma média de 16 a 17 dias de duração, onde o momento da ovulação ocorre de 24 a 30 horas após o início do cio (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Segundo HEAPE (1990), uma forma de dividir o ciclo estral seria a classificação em proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro (fase folicular) caracteriza-se pela ocorrência do crescimento folicular e secreção de estrógenos, sob estímulo de gonadotrofinas hipofisárias e tem duração de dois a três dias. O estro varia de 20 a 36 horas, com média de 26 horas, sendo a ovulação ocorrida em terço final, lembrando que na espécie ovina e caprina as ovulações duplas e triplas são comuns, e estas ocorrem dentro de 2 horas após a primeira ovulação. O metaestro compreende o período de formação do corpo lúteo, e para fins práticos, tem sua inclusão no diestro. O diestro (fase lútea) é a fase dominante no ciclo estral na ovelha, dura de 12 a 14 dias e caracteriza-se pela secreção de progesterona efetuada pelo corpo lúteo (SASA, 2003; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.2. Controle endócrino

Para o ciclo estral ocorrer é necessário a integração entre o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano e o sistema nervoso, aliado às influências relacionadas ao ambiente. Os hormônios de origem hipotalâmica (hormônio liberador de gonadotrofinas- GnRH), hipofisária (hormônio folículo estimulante – FSH e hormônio luiteinizante – LH), ovarianos (estradiol, progesterona) e uterino (prostaglandina) constituem a base do funcionamento reprodutivo (HAFEZ et al, 2004; THOMPSON, 2006).

O hipotálamo secreta GnRH de forma pulsátil, e é liberado na corrente sanguínea, que tem como destino a adenohipófise onde estimula a liberação de LH e FSH, sendo que a frequência e a amplitude da liberação do GnRH determinam qual deles será liberado. O controle da secreção de FSH é realizado não só pelo GnRH mas também pelos esteróides (progesterona e estradiol). O FSH ativa o metabolismo celular no ovário, favorecendo a mutiplicação celular e determinando o início da onda de crescimento folicular. A secreção de LH pela adenohipófise dá-se a nível basal e pulsátil e promove o crescimento do folículo dominante e ovulação. No ovário, o estradiol é sintetizado e liberado na fase folicular do ciclo pelas células da granulosa e a progesterona pelo corpo lúteo (CL) na fase luteal (HAFEZ et al, 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; THOMPSON, 2006)

A fase luteal caracteriza-se pela ocorrência de um ou mais corpos lúteos nos ovários, resultantes do rompimento do(s) folículo(s) ovulatório(s). À medida que a fase lútea progride o CL produz um volume crescente de progesterona até que se atinge um platô, iniciado por volta do sexto dia do ciclo estral, mantendo-se até a luteólise. Durante, a fase luteal, quando a concentração de progesterona é alta e a de estradiol relativamente baixa, a frequência dos pulsos de GnRH diminui. Entretanto, a frequência dos pulsos de GnRH aumenta e a amplitude diminui durante a metade da fase folicular, quando a progesterona tem sua concentração reduzida e a de estradiol aumentada. Assim, em ovelhas ciclando, o estradiol aumenta a freqüência dos pulsos de LH e diminui sua amplitude desencadeando o pico de LH (HAFEZ et al, 2004; THOMPSON, 2006; MORAES et al., 2008).

O aumento nos níveis de secreção de progesterona com o desenvolvimento do CL inibe os receptores de ocitocina uterinos, os quais estão relacionados com a liberação da prostaglandina-2α (PGF2α). Com o término da fase lúteal a concentração de progesterona declina rapidamente induzida pela secreção de PGF2α que promove a regressão do CL (luteólise). A PGF2α do período de luteólise é proveniente de secreções pulsáteis emitidas pelo endométrio que provocam a regressão do CL (McCRACKEN *et al.,* 1984).

Nos ovinos, um mecanismo de controle retrógrado positivo estimula a secreção pulsátil de PGF2α tendo a ocitocina um papel central nesse processo (McCRACKEN *et al*., 1984). A ocitocina sintetizada pelo hipotálamo é liberada pela neurohipófise e junto com a secreção de ocitocina do CL, estimula a produção de PGF2α pelo útero, caracterizando o processo de retroalimentação positiva. Nesse momento, a lutéolise tem início como resultado da elevação e ativação de receptores de estradiol (E2), que induzem um aumento no número de receptores de ocitocina no endométrio, deflagrando o mecanismo de retroalimentação (HAFEZ et al, 2004; THOMPSON, 2006)

A queda na concentração de progesterona permite a elevação da secreção de estradiol pelo ovário que é estimulada pelo aumento na freqüência dos pulsos de GnRH e LH. Em contraste, a concentração de FSH declina inibida pela secreção crescente de estradiol e inibina, pelo folículo pré-ovulatório (HAFEZ et al, 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; THOMPSON, 2006; MORAES et al., 2008).

O pico pré-ovulatório de LH é responsável pela ovulação, luteinização do folículo e subsequente formação do CL, e com seu desenvolvimento a concentração de progesterona plasmática secretada por ele aumenta. Após o pico de LH e ovulação, enquanto os níveis de LH e esteróides estão baixos, ocorre concomitantemente aumento na concentração de FSH um dia após a ovulação, seguido por um aumento na secreção de estradiol e de um “pool” de novos folículos antrais (HAFEZ et al, 2004; THOMPSON, 2006; MORAES et al., 2008).

Quando o CL é mantido pela existência de reconhecimento materno da gestação, resulta em um contínuo efeito de retro alimentação negativo e anestro

durante a gestação estendendo até o período pós-parto (STABENFELDT & EDQVIST, 1996). A produção de abundantes quantidades de estradiol ou progesterona pela placenta, durante o final da gestação exercem forte efeito inibitório sobre o hipotálamo, diminuindo a liberação de GnRH (SHORT *et al*., 1990).

No pós-parto, com a redução da concentração plasmática de estradiol, após a liberação do feto e da placenta, a inibição do FSH termina e, consequentemente seus níveis se elevam para estimular o desenvolvimento folicular na primeira semana após o parto. Ao contrário do FSH que é produzido e liberado, o LH precisa ser produzido e armazenado na adenohipófise, para que o folículo dominante chegue à ovulação. A reposição dos estoques hipofisários de LH exige de 2 a 3 semanas. À medida que transcorre o período pós-parto, os estoques de LH hipofisários vão sendo restabelecidos. A concentração plasmática e a frequência de pulsos de LH aumentam linearmente e pode-se verificar que, a cada onda folicular, o diâmetro do folículo dominante vai se tornando cada vez maior, as concentrações de estradiol se elevam, exercendo uma retroalimentação positiva ao LH, que é seguido pela ovulação. A maturação final e a ovulação de um folículo dominante é dependente da regularidade de pulsos de LH secretado pela adenohipófise (YAVAS & WALTON, 2000).

A retroalimentação negativa exercida pelo estradiol no eixo hipotalâmico-hipofisário e o padrão de pulsação inadequada do LH contribuem para o atraso do retorno da atividade ovariana e do comportamento estral no pós-parto de ovelhas (ARAÚJO, 2006).

Os folículos dominantes provenientes de ondas ovulatórias anteriores permanecem em um ambiente hormonal com predomínio de atividade progesterônica (corpo lúteo ativo) e acabam por entrarem em atresia em função do aporte gonadotrófico inadequado, isto é, LH insuficiente, até que a atividade luteal (produção de progesterona) atinja níveis mínimos por ocasião da luteólise (FONSECA, 2006).

Em ovelhas, o mecanismo de dominância do folículo dominante é diferente do que ocorre em cabras e vacas. Na ovelha o folículo dominante só diminui o crescimento de folículos novos, mas não inibe como ocorre em vacas (GONZALEZ-BULNES *et al*., 2001).

2.3. Fotoperíodo

Ovelhas são poliéstricas estacionais de dias curtos, ou seja, apresenta um modelo de reprodução sazonal com uma incidência de ciclos estrais concentrada durante o outono e o inverno. O estímulo para a manifestação e/ou intensificação dos fenômenos reprodutivos é o decréscimo do número de horas de luz por dia (fotoperíodo). Esse fenômeno tende a diminuir ou cessar com a proximidade da Linha do Equador (HAFEZ & HAFEZ, 2004; FONSECA, 2006).

Durante os dias longos (primavera e verão), a atividade sexual diminui, com os animais apresentando desde completo anestro até irregularidades dos ciclos. Nas regiões de latitudes inferiores (regiões equatoriais e tropicais), onde as mudanças de fotoperíodo são mínimas, a estacionalidade da reprodução é pouco evidente e mais dependente de variações na alimentação e nas condições climáticas (MORAES et al., 2008).

2.4. Dinâmica Folicular

Dinâmica folicular é o processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais que permite o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (LUCY et al., 1992). Nas ovelhas o desenvolvimento folicular ocorre em ondas, tanto na estação reprodutiva e anestro estacional, como durante o início da gestação e pós-parto (GINTHER & KOT, 1994; GINTHER et al., 1996; SOUZA et al., 1996; LOPEZ SEBASTIAN et al., 1997; LEYVA et al., 1998; BARTLEWSKY et al., 1998, 1999, 2000; EVANS, 2003). Elas emergem com intervalos de quatro a seis dias, sob estímulo do FSH, variando de duas a quatro ondas (GINTHER & KOT, 1994; EVANS, 2003), sendo mais freqüentes três ondas foliculares por ciclo (RUBIANES, 2000a).

Existe forte evidência experimental que, durante a primeira e a última onda folicular, ocorre o mecanismo denominado dominância (GINTHER et al., 1996). Onde é selecionado um folículo, de vários recrutados, que continuará crescendo, enquanto os outros entram em atresia (MENCHACA et al., 2002).

O folículo dominante é dependente da pulsatilidade do FSH na sua fase final do crescimento (BAIRD & McNEILLY, 1981). O folículo dominante de uma onda será o folículo ovulatório, se conseguir estabelecer uma cascata endócrina com o LH, que acarretará no pico pré-ovulátorio de LH. Caso não aconteça, ele entrará em atresia, enquanto emerge outra onda folicular (GINTHER et al., 1996).

A respeito das ondas intermediárias durante o ciclo estral, é sustentado que a dominância não está presente, porque as mesmas possuem aporte gonadotrófico inadequado, ou seja, quantidades insuficientes de LH (RUBIANES, 2000b).

O padrão de crescimento folicular em ovelhas parece ser mais dinâmico e menos pronunciado que na vaca (SIROIS & FORTUNE, 1990; SAVIO et al., 1993) sendo que a taxa de ovulação é mais alta na espécie ovina (DRIANCOURT et al., 1991; DRIANCOURT, 1994). O ovário da ovelha contém de 100 a 400 folículos que crescem em cada ciclo, de os quais 10 a 40 são visíveis na superfície do ovário (McNATTY et al., 1982).

2.5. Sincronização e Indução do Estro e da Ovulação e Superestimulação

Biotécnicas como a indução e sincronização do estro em ovinos vêm sendo bastante utilizadas, em conseqüência de proporcionarem cada vez mais a atividade reprodutiva (SAFDARIAN et al., 2006) mesmo durante os períodos de anestro sazonal e lactacional (GUIDO et al., 1999; AMORIM et al., 2007; GdeNICOLO et al., 2007). Os métodos mais utilizados para a sincronização do estro e estimulação do crescimento folicular em pequenos ruminantes envolvem prostaglandinas (WEEMS et al., 2006; URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2008a;), progesterona e/ou progestágenos e a administração intramuscular de eCG (LÓPEZ-SEBASTIAN et al., 2007; HOLTZ et al., 2008; URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2008b)

Grande melhoria em programas de superovulação tem sido observada nas últimas três décadas pela substituição do eCG por preparados de FSH geralmente de origem ovina, suína e caprina (ARMSTRONG & EVANS, 1983; JABBOUR & EVANS, 1991). Com este hormônio se obtêm taxas de ovulações superiores e menor incidência de folículos anovulatórios, além de resposta individual mais uniforme quando comparado aos tratamentos com eCG (ARMSTRONG & EVANS, 1983)

A resposta ovariana de ovelhas varia com o tipo e dispositivo intravaginal e o tipo e progestágenos utilizados (ROMANO, 1996). A sincronização do ciclo estral ou a indução do estro em ovelhas em anestro tem sido realizada com o uso de esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos (Acetato de medroxiprogesterona – MAP ou acetato de fluorogestona – FGA) por 12 a 14 dias (IIDA et al., 2004; ZELEKE et al, 2005).

Outro tipo de dispositivo encontrado no mercado é o CIDR ("Controlled Internal Drug Release"), o qual libera progesterona natural (P4) gradativamente através da mucosa vaginal para a corrente sanguínea do animal (RUBIANES, 2000).

A indução e a sincronização do estro são importantes e até mesmo indispensáveis quando são empregados em sistemas intensivos de produção ou quando se deseja a quebra da estacionalidade reprodutiva em algumas raças, bem como na utilização da inseminação artificial em momento prefixado. Dentre os diversos processos e protocolos existentes deve-se considerar a estacionalidade reprodutiva dos ovinos, uma vez que, dependendo da época do ano, será peculiar a técnica a ser empregada (MORAES et al., 2008).

2.5.1.Prostaglandinas

O uso das prostaglandinas (PG_s) é uma alternativa para a sincronização dos estros, importante na formação de sistemas simples e de curta duração. A $PGF_2\alpha$ é o fator luteolítico em ruminantes (GINTHER et al., 2009), que induz à regressão do

corpo lúteo através da interrupção da fase progestacional do ciclo estral, iniciando, assim um novo ciclo (HACKETT & ROBERTSON, 1980; HERRERA et al., 1990)

Durante a estação reprodutiva, a sincronização de estro em ovinos e caprinos pode ser empregada com o uso de prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$), em dose única ou duas doses com um intervalo de 10 dias (FONSECA et al.,2003, FONSECA, 2006; GONZALES-BULNES et al.,2005), induzindo a regressão do corpo lúteo (CL) (McCRACKEN et al., 1972). O encurtamento desse intervalo para 7 dias tem apresentado melhores resultados. Isto é possível porque a segunda dose de $PGF_2\alpha$ é administrada no quinto dia do ciclo estral. Nesse período, os folículos dominantes da primeira onda folicular ainda estão em fase de crescimento e os corpos lúteos já estão responsivos à ação da $PGF_2\alpha$ (HACKETT & ROBERTSON, 1980; NAASZ & SLYTER, 1987; RUBIANES et al.,2003; MENCHACA & RUBIANES, 2004).

No caso de duas aplicações, a utilização ou não do estro após a primeira aplicação é facultativa. Após a segunda dose, há um maior percentual de animais em estro (FONSECA et al., 2003; FONSECA, 2006). Também pode ser feita a associação de prostaglandina com os dispositivos intravaginais contendo progestágenos ou progesterona (FONSECA et al., 2004).

2.5.2. Progestágenos e Dispositivos Intravaginais

O nome progestágeno é utilizado para substâncias farmacológicas de efeito similar a progesterona (P4). O progestágeno é utilizado para inibir o desenvolvimento de um corpo lúteo em fêmeas que ovularam recentemente (próximo à data da colocação do dispositivo com progestágeno) ou inibir a ovulação caso a fêmea esteja no fim do ciclo estral (ODDE, 1990). Ou seja, se o progestágeno for colocado por 12 ou 14 dias, faz com que ocorra a regressão do corpo lúteo, mas o estro e a ovulação vão se manifestar apenas quando a P4 exógena for removida (CASTONGUAY et al., 1990).

O pré-tratamento com progesterona previne a luteólise, diminuindo os níveis de receptores de ocitocina no endométrio. Nas ovelhas em anestro, causa uma

redução da sensibilidade uterina ao estradiol no início do diestro (VALLET et al., 1990) permitindo a manutenção do corpo lúteo (BEARD & HUNTER, 1996). O pré-tratamento com progesterona retarda a onda de LH permitindo uma adequada maturação do folículo ovulatório e subseqüente função normal do corpo lúteo (KEISLER & KIESLER, 1983).

Mais comumente são utilizadas esponjas impregnadas com acetato de fluorogestona (FGA) (FREITAS et al., 1996), ou acetato de medroxiprogesterona (MAP) (ROBINSON, et al., 1967), implantes auriculares de norgestomet (FREITAS et al., 1997), administrações orais diárias de MAP (GOSWANI et al., 1998), bem como o CIDR®, um dispositivo intravaginal liberador de progesterona natural, com custo superior ao da esponja. Este produto pode ser reutilizado após higienização ao término do tratamento de curta duração (RUBIANES et al., 2000a).

2.5.3. Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG)

O hormônio eCG, apresenta uma dupla atividade (LH e FSH) e sua meia-vida é bastante longa (120 horas), por conseqüência da sua cadeia polissacarídica, que a mantém na circulação (COMBARNOUS, 1993)

O eCG muitas vezes é utilizado em protocolos hormonais com associação da P_4, que pode ser utilizado tanto na estação reprodutiva quanto fora dela, para estimular o crescimento folicular (EVANS & ROBINSON, 1980; EVANS & MAXWELL, 1987; RUBIANES et al., 1998). Os protocolos desenvolvidos recomendam manter o dispositivo vaginal de P4 por períodos de doze a quatorze dias. Esses protocolos resultam em altas taxas de indução de estros nos animais tratados, porém com baixa fertilidade. Isso ocorre porque o tempo de manutenção do dispositivo gera um excessivo período de crescimento do folículo e, consequentemente, o envelhecimento do oócito (VIÑOLES et al., 2001). Ademais, o uso excessivo de hormônios eCG pode provocar a produção de anticorpos anti-eCG, o que acarreta na diminuição da eficiência do tratamento hormonal (BARIL et al., 1996).

2.5.4. Hormônio folículo estimulante (FSH)

Técnicas que utilizam aplicações de FSH são mais eficientes comparadas com aquelas que utilizam eCG (ARMSTRONG et al,1983; SENTHILKUMAR et al.,1999). Assim, melhorias em programas de superovulação tem sido observadas nas últimas três décadas pela substituição do eCG por preparados de FSH geralmente de origem suína, ovina e caprina (ARMSTRONG & EVANS, 1983; JABBOUR & EVANS, 1991).

As dosagens variam em função da espécie (ovelha ou cabra), estação, raça e peso corporal (LOI et al., 1988; COGNIÉ et al., 2003; CORDEIRO et al., 2003), mas os melhores resultados são alcançados quando o tratamento inicia-se 48 horas antes da retirada do prostágeno, com aplicações de FSH a cada 12 horas (COGNIÉ et al., 2003)de 6 a 8 injeções em doses decrescentes (HOFFMAN et al., 1988), durante 3 - 4 dias (LÓPEZ SEBASTIÁN et al., 1991; COGNIÉ, 1999).

2.6. Tratamentos Hormonais e o Pico de LH

Para a utilização das biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, deve-se conhecer a relação entre o início do estro, o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) e a ovulação, já que o início do estro é um dos melhores parâmetros para prever o momento em que ocorrerá a ovulação (SILVA &NUNES, 1984)

A utilização de tratamentos hormonais para a superestimulação folicular pode provocar alterações ovarianas ou endócrinas (KAFI & MCGOWAN, 1997). Essas alterações vão refletir principalmente no desenvolvimento folicular pré-ovulatório (ROBINSON et al., 1968) ou em eventos endócrinos como o padrão de pulsatilidade e a ocorrência do pico de LH (BEVERS, et al., 1989; BEN JEBARA et al.,1994; D'OCCHIO et al., 1999). Estes efeitos sobre a liberação do hormônio luteinizante (LH) em padrões normais ou o desenvolvimento folicular induzido pelos tratamentos hormonais podem provocar uma diminuição no número e na qualidade dos embriões recuperados. Os possíveis mecanismos podem estar relacionados a alterações da maturação dos oócitos (MOOR et al., 1985; HYTTEL et al., 1991), na

ovulação (KAFI & MCGOWAN, 1997), no transporte de espermatozóides e fertilização dos oócitos (HYTTEL et al., 1991) e no desenvolvimento embrionário (HUNTER, 1988).

Tais fatos interferem no processo de ovulação de modo a induzir falhas como folículos anovulatórios (BEVERS et al., 1989) e luteinizados (MONNIAUX et al., 1983). Ovulações prematuras (DRIANCOURT & FRY 1992), tardias ou assincrônicas (COGNIÉ et al., 2003) também têm sido descritas como resultado da superestimulação gonadotrófica. Estes acontecimentos causam subsequentes falhas de fecundação, devido à presença de oócitos ou espermatozóides envelhecidos no momento da fecundação (JABBOUR & EVANS, 1991). Desta forma, observa-se redução na eficiência destes protocolos, relacionadas ao número de embriões transferíveis (COGNIÉ et al., 2003).

Intervalos entre o comportamento de estro, pico de LH e ovulação também podem ser afetados em tratamentos hormonais. Assim a investigação do momento do pico pré-ovulatório de LH é um dos melhores parâmetros para prever o tempo da ovulação, pois o intervalo entre a ocorrência do pico de LH e a ovulação é bastante constante para as várias espécies domésticas (MAUREL & COMBARNOUS, 1994).

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Verificar o momento e a amplitude do pico pré-ovulatório de LH em ovelhas superestimuladas nos diferentes períodos (transição, ciclicidade e anestro);
- Relacionar o momento do pico pré-ovulatório de LH e início do estro;

4. HIPOTESE

A superestimulação na primeira ou última onda folicular nos períodos de ciclicidade, transição ou anestro afetam o momento e amplitude do pico pré-ovulatório de LH

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Localização e Caracterização da Área

O experimento foi realizado no Câmpus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, localizada no Município de Jaboticabal (21º15'17" latitude sul e 48º19'20" longitude oeste), estado de São Paulo, Brasil, onde o clima de acordo com a classificação de Köeppen é inverno seco e verão úmido, com médias térmicas anuais de 22ºC. Entre os meses de outubro e março ocorrem muitas chuvas e também altas temperaturas, e o período de seca é de maio a agosto**.**

5.2. Animais e grupos

Todos os animais foram mantidos em sistema intensivo de produção, sendo alimentados com silagem de milho, onde tiveram acesso *ad libitum* à água e sal mineral.

Foram utilizadas 60 ovelhas da raça Santa Inês (20 ovelhas por estação), não prenhes e não lactantes. Foram selecionadas fêmeas com peso entre 39,54±5,51 e com escore 3±1, como sugerido por RUSSEL et al. (1969) e consideradas hígidas após um exame clínico geral e controle de verminose, aptas a reprodução após exame ginecológico dos órgãos reprodutivos.

As ovelhas de cada estação foram divididas aleatoriamente em dois grupos que receberam concomitantemente tratamentos superovulatórios distintos, iniciados na primeira e última ondas foliculares. O mesmo foi repetido nas estações: anestro (julho a novembro/2010); transição (dezembro/2010 a fevereiro/2011) e; ciclicidade (março a junho/2011;Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos experimentais preconizados para tratamentos de superovulação e colheita de embriões em ovelhas da raça Santa Inês.

Grupos	Tratamentos	Período estacional
POF	Protocolo de primeira onda folicular	Anestro (n=10)
		Transição (n=10)
		Ciclicidade(n=10)
UOF	Protocolo de ultima onda folicular	Anestro (n=10)
		Transição (n=10)
		Ciclicidade(n=10)

n= números de animais por grupos
POF= primeira onda folicular; UOF= ultima onda folicular

5.3. Tratamento Hormonal.

Os protocolos utilizados no presente trabalho basearam-se em um estudo preliminar da dinâmica folicular em protocolos base para superovulação em ovelhas da raça Santa Inês (OLIVEIRA, 2011). Os dias de início dos tratamentos gonadotróficos foram definidos de acordo com as emergências das ondas foliculares.

As fêmeas do grupo tratado com o protocolo de superestimulação iniciado na primeira onda tiveram o estro sincronizado com a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (Eazi- Breed CIDR™ - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia) e administração de 37,5 µg de D- Cloprostenol (Prolise™, Tecnopec, ARCA S. R. L., Argentina), IM, em um dia aleatório do ciclo estral (D0). O dispositivo permaneceu até o Dia 6 (Anestro e transição) ou até o Dia 8 (Ciclicidade) do protocolo. O tratamento superestimulatório com FSHp (Folltropin™, Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc.,Canadá) foi iniciado no Dia 4 (anestro e transição) ou Dia 6 (ciclicidade) e consistiu na administração de 200 mg do hormônio em oito doses decrescentes (40,40,30,30,20,20,10,10mg) a intervalos de 12 horas. Na retirada do dispositivo, independentemente da estação, as fêmeas deste grupo receberam 37,5 µg de D- Cloprostenol (Prolise™, Tecnopec, ARCA S. R. L., Argentina), e 300UI eCG (Novormon 5000™, Shering-Plough S. A., Syntex S.A., Argentina) administrado via intramuscular. (Figura 1)

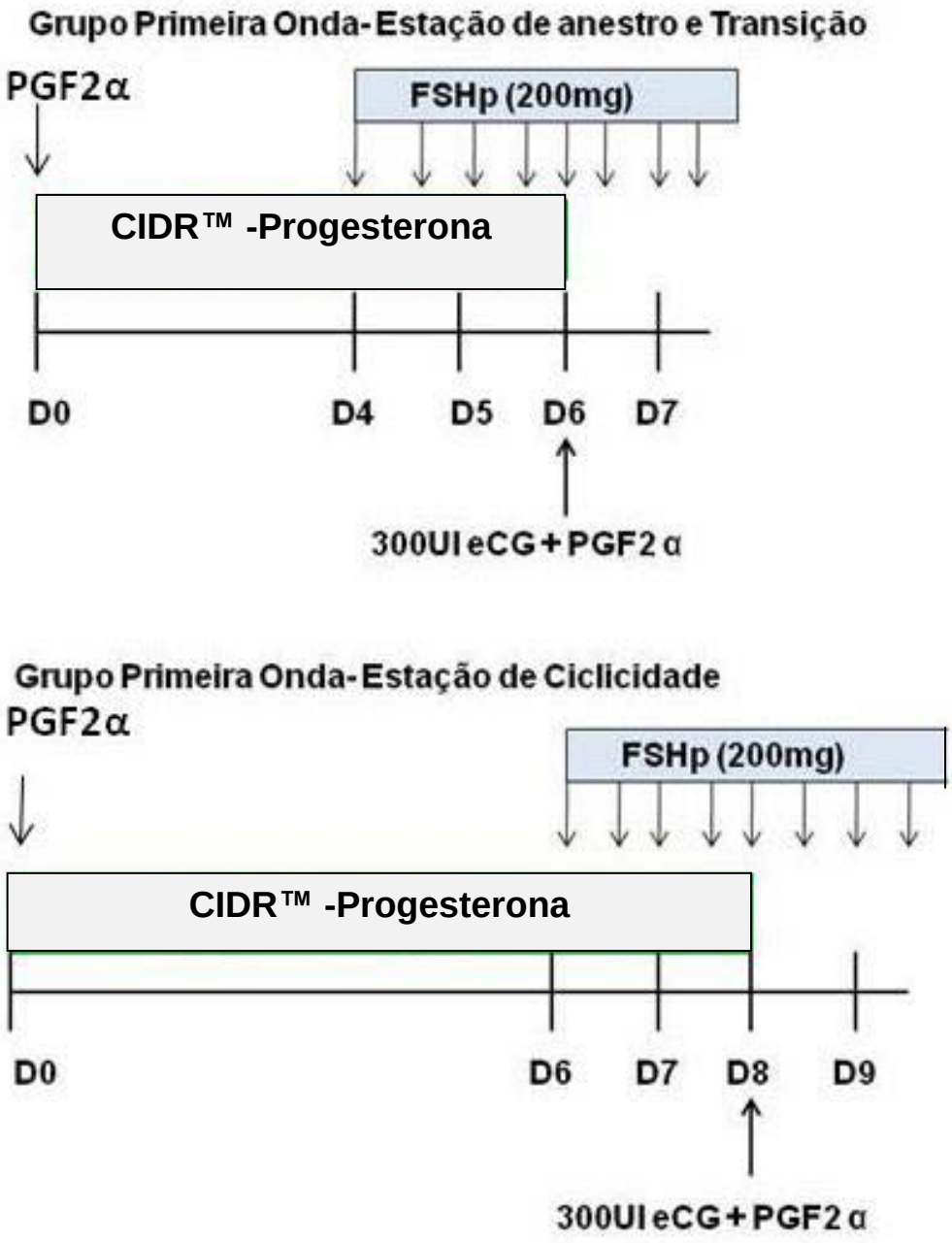

Figura 1 - Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação da primeira onda folicular.

As fêmeas do grupo tratado pelo protocolo de superestimulação iniciado próximo a última onda folicular receberam em um dia aleatório (D0) dispositivo intravaginal de progesterona (Eazi- Breed CIDR™ - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia). Concomitantemente a esta colocação, foi aplicada 37,5 µg de D- Cloprostenol (Prolise™, Tecnopec, ARCA S. R. L., Argentina) por via intramuscular. Os dispositivos permaneceram por períodos distintos entre as estações: doze (anestro e transição) ou treze dias (ciclicidade). No período de transição, o dispositivo foi substituído por um novo no Dia 7, o qual permaneceu até completar o período total descrito (Dia 12). Na retirada do dispositivo, independentemente da estação, as fêmeas deste grupo receberam 37,5 µg de D-Cloprostenol (Prolise™, Tecnopec, ARCA S. R. L., Argentina), e 300UI eCG (Novormon 5000™, Shering-Plough S. A., Syntex S.A., Argentina) administrado via intramuscular. O tratamento superestimulatório (Folltropin™, Tecnopec, Bioniche A. H. C. Inc., Canadá) consistiu na administração de 200 mg de FSHp em oito doses decrescentes (40,40,30,30,20,20,10,10) a intervalos de 12 horas iniciada nos dias 10 (anestro e transição) ou 11 (ciclicidade) do protocolo (Figura 2).

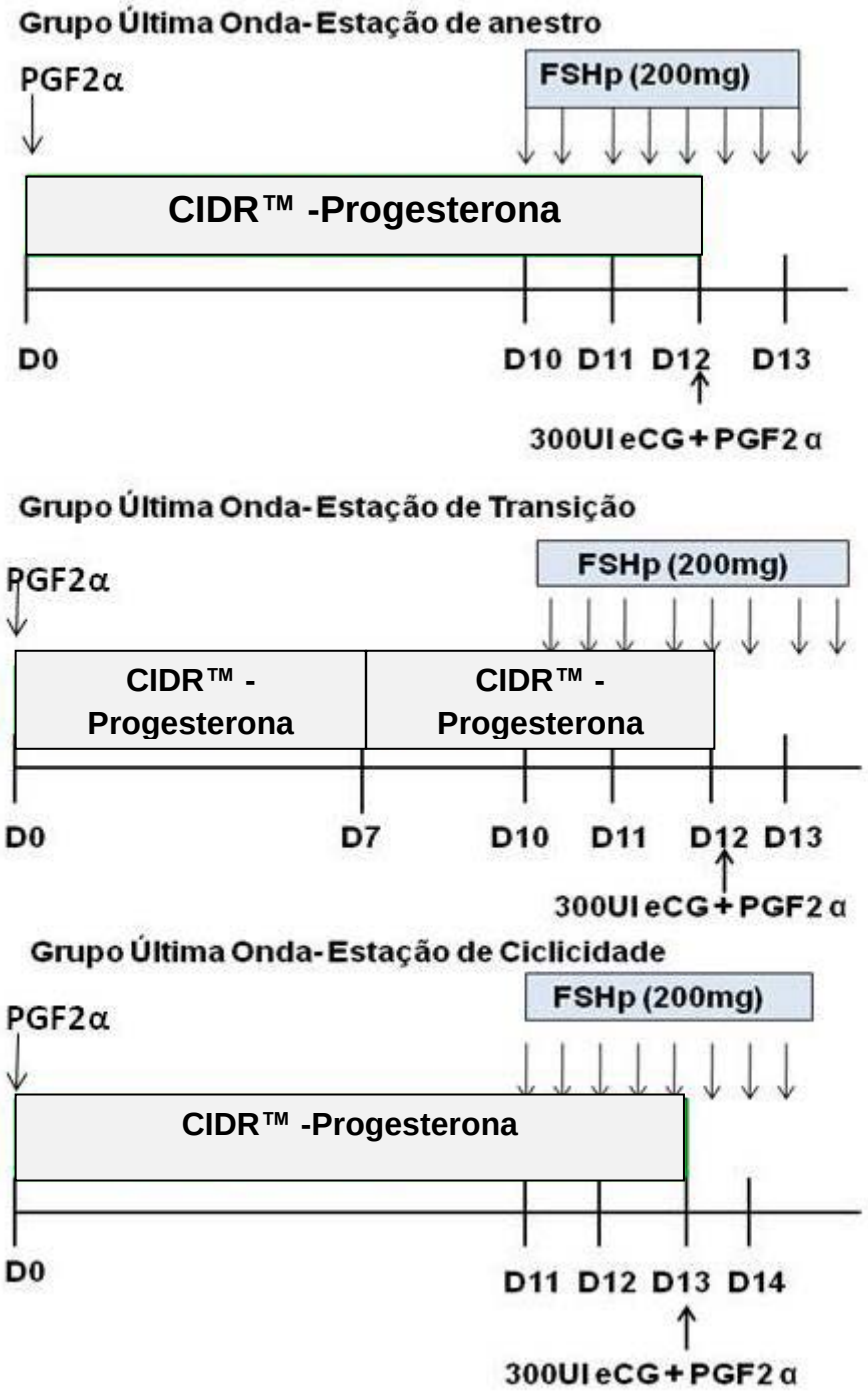

Figura 2- Esquema dos protocolos hormonais destinados à superovulação da ultima onda folicular

5.4. Detecção do Estro

A detecção do estro foi realizada ao final dos tratamentos com progesterona, ou seja, após a retirada dos dispositivos vaginais – CIDR. Os machos (rufião) tiveram o peitoral manchados, utilizando graxa colorida. A identificação das fêmeas em estro foi monitorada três vezes ao dia, durante 63 horas, detectando assim o momento inicial do estro.

5.5. Ovulação

A ovulação foi detectada pela ausência do(s) folículo(s) dominante(s) detectados por exames anteriores e confirmados pela presença do(s) corpo(s) lúteo(s), após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona. Os exames ultrassonográficos foram realizados com intervalos de 8 horas durante 72 horas.

Em síntese, as observações foram conduzidas com a fêmea em posição quadrupedal, tendo a parede abdominal comprimida, para facilitar a visualização do útero e ovários. Utilizou-se equipamento de ultrassom[1], em modo-B tempo real, contendo transdutor linear multifrequencial (6 e 8 MHz). Um tubo de plástico ligeiramente curvado (comprimento 30 cm) foi fixado ao cabo do transdutor para permitir sua manipulação externamente. Após deposição do gel[2] sobre o transdutor, este foi introduzido no reto com a superfície de contato posicionada perpendicularmente a parede abdominal. Quando a bexiga urinária e cornos uterinos foram localizados, o transdutor foi lentamente rotacionado para esquerda e direita a fim de se observar os ovários e suas estruturas (OLIVEIRA, 2011).

5.6. Colheitas de sangue

As colheitas de sangue foram realizadas com intervalos de 3 horas, iniciando 24 horas após a retirada do dispositivo intra-vaginal, independentemente do tratamento ou estação, totalizando 63 horas. Foi realizada a punção da veia jugular

---

[1] Ultra-som, Aquila, Pie Medical, Holanda

[2] Gel à base de carboxi-metil-celulose, Gerbras, Latino Química Antex, Argentina

com seringas contendo heparina. Imediatamente após a colheita, o material foi centrifugado a 2000 × g por 15 minutos, em temperatura de 4ºC. O plasma obtido foi aliquotado em duplicatas, devidamente identificadas e armazenadas a -20°C.

5.7. Dosagem de LH

As alíquotas de plasma congeladas foram destinadas a dosagem de LH no departamento de apoio, produção e saúde animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Araçatuba (CENEN: AP0887). O método utilizado foi o de radioimunoensaio (RIA) de duplo anticorpo para a dosagem de LH bovino, conforme metodologia descrita por BOLT, SCOTT E KIRACOFE (1990). O primeiro anticorpo utilizado foi o NIDDK-anti-o-LH-1. Foram utilizados conjuntos de reagentes desenvolvidos para avaliação quantitativa da amostragem de LH, sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, valendo-se do I^{125}, como elemento radioativo traçador.

5.8. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System (SAS™), por análise de variância (ANOVA) usando o procedimento General Linear Models (GLM). As médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P<0,05$) e confirmadas pelo teste de Tukey. Os percentuais foram analisados pelo teste de Qui-quadrado.

6. RESULTADO

6.1. Momento do estro

A manifestação do estro nas ovelhas superovuladas, na primeira ou ultima onda folicular, durante os períodos de anestro ou transição ou ciclicidade foi observada em todos os animais. O intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o início do estro não diferiu entre os grupos de primeira ou ultima onda (p>0,05) e nem entre os períodos estacionais, anestro, transicional e ciclicidade (p>0,05). Os valores médios do tempo para o início da manifestação do estro após a retirada do dispositivo de progesterona estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios (±S.E.M.) para o intervalo entre o final dos protocolos de superovulação (retirada do dispositivo intravaginal– CIDR) e o momento do início do estro de acordo com os grupos e períodos estacionais.

Início do estro após retirada do CIDR	Anestro	Transição	Ciclicidade
Primeira Onda Folicular	18,00±2,00	19,80±1,56	20,40±0,98
Ultima Onda Folicular	19,20±1,95	19,80±1,58	20,40±0,98

P>0,05 entre grupos dentro de períodos estacionais.

O intervalo de início do estro após remoção do implante de progesterona entre as ovelhas foi avaliado com 12, 18 e 24 horas. A distribuição dos animais quanto a este momento está expressa na figura 3

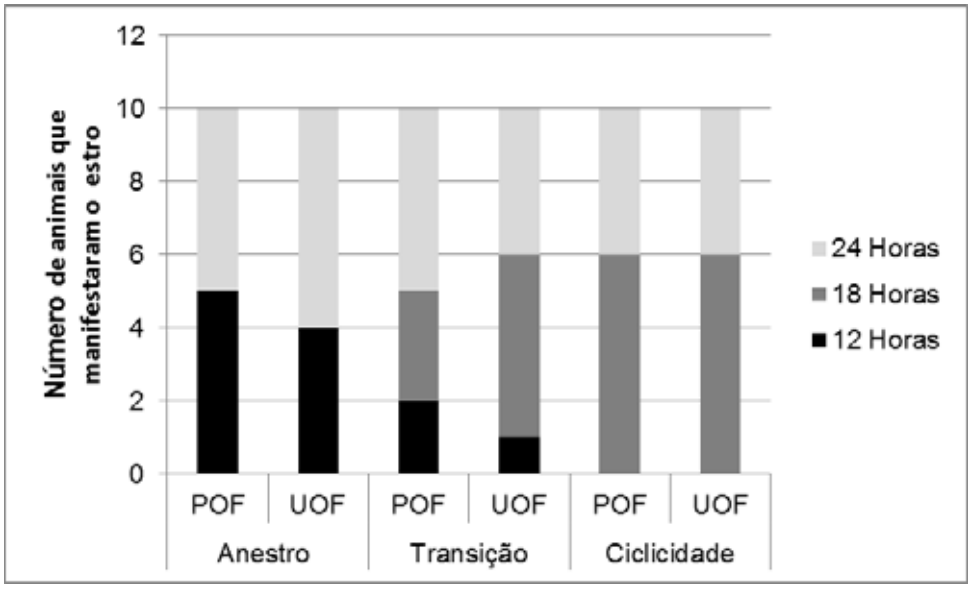

Figura 3 – Distribuição do número de ovelhas que apresentaram o início do estro após a retirada do dispositivo intravaginal (CIDR) nos diferentes grupos e períodos estacionais.

6.2. Ovulação

O número médio de ovulações e a taxa de ovulação nas ovelhas submetidas à superovulação com FSH na primeira onda folicular ou ultima onda folicular durante os períodos de anestro, transição ou ciclicidade estão apresentados nas tabelas 3, 4 e 5.

A variação individual dos animais quanto ao número de ovulações ficou bem marcante neste experimento, onde em um animal foi ausente e o maior número de ovulações, observado no grupo de animais durante o período de ciclicidade.

Tabela 3 - Índices da ovulação em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de anestro.

	Anestro						
	Primeira Onda Folicular			Ultima Onda Folicular			
	Média	Valores		Média	Valores		
Variáveis		Min	Max		Min	Max	P
Nº de Ovulações	12,40±0,95	9	17	12,60±1,87	4	26	0,63
Taxa de ovulação(%)	89,20±4,15	61	100	83,50±6,17	35	120	0,13

P>0,05

Tabela 4 - Índices da ovulação em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de Transição.

	Transição						
	Primeira Onda Folicular			Ultima Onda Folicular			
	Média	Valores		Média	Valores		
Variáveis		Min	Max		Min	Max	P
Nº de Ovulações	13,10 ± 2,31	6	26	14,00±1,85	7	25	0,99
Taxa de ovulação(%)	90,80 ± 3,19	67	100	93,10±2,25	80	100	0,85

P>0,05

Tabela 5 - Índices da ovulação em ovelhas Santa Inês tratadas com protocolos de superovulação iniciados próximo a emergência da primeira e última ondas foliculares do tratamento, no período de Ciclicidade.

	Ciclicidade						
	Primeira Onda Folicular			Ultima Onda Folicular			
	Média	Valores		Média	Valores		
Variáveis		Min	Max		Min	Max	P
Nº de Ovulações	17,00 ± 2,31	11	34	12,50±2,62	0	29	0,03
Taxa de ovulação(%)	97,90±1,45	87	100	88,55 ±4,45	60	100	0,04

P>0,05

6.3. Momento do pico pré-ovulatório de LH

O Momento do pico pré-ovulatório de LH ocorreu entre 24 a 48 horas após a retirada do implante vaginal. Assim, o momento do pico pré-ovulatório, entre os tratamentos de superovulação não diferiu entre os grupos (P>0,05; Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios (±S.E.M.) para o momento do pico pré-ovulatório de LH, em horas, em relação à retirada do dispositivo intravaginal –CIDR.

	Anestro		Transição		Ciclicidade	
	POF	UOF	POF	UOF	POF	UOF
Momento Pico de LH (h)	30,30±1,57	29,60±1,62	33,00±1,54	33,33±1,20	31,20±0,91	31,50±1,43

P>0,05;

O intervalo entre o início do estro e o pico pré-ovulatório de LH das ovelhas superovuladas com FSH, na primeira e ultima onda folicular, no período de anestro ou transição ou ciclicidade foram similares (P>0,05; Tabela 7), entretanto os animais em anestro de ultima onda folicular apresentaram o intervalo menor (7,40±1,78) do que os demais grupos e períodos.

Tabela 7 - Valores médios (±S.E.M.) do intervalo entre a manifestação do estro e pico pré-ovulatório de LH em horas, em relação à retirada do dispositivo intravaginal –CIDR.

	Anestro		**Transição**		**Ciclicidade**	
	POF	UOF	POF	UOF	POF	UOF
Intervalo entre estro e pico de LH	12,3±1,78	7,40±1,78	13,20±1,55	13,53±1,39	10,8±0,94	11,10±1,20

P>0,05;

6.4. Amplitude do pico pré-ovulatório de LH

As variações séricas de LH nas 63 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4 estão apresentadas para os grupos tratados com os protocolos de superovulação iniciados próximo à emergência da primeira e última onda folicular de acordo com os períodos estacionais estão representados nas Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

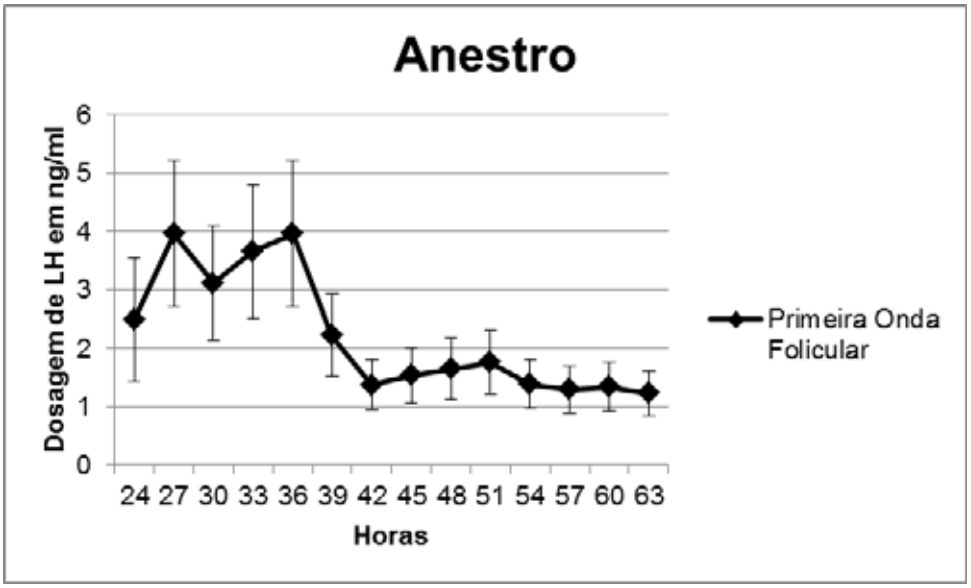

Figura 4 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular no período de anestro.

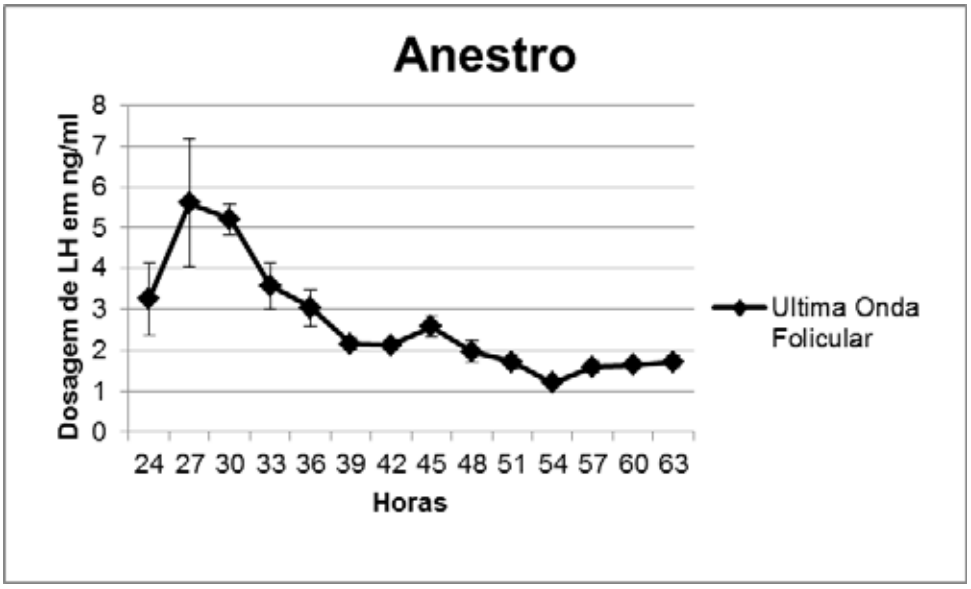

Figura 5 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da ultima onda folicular no período de anestro.

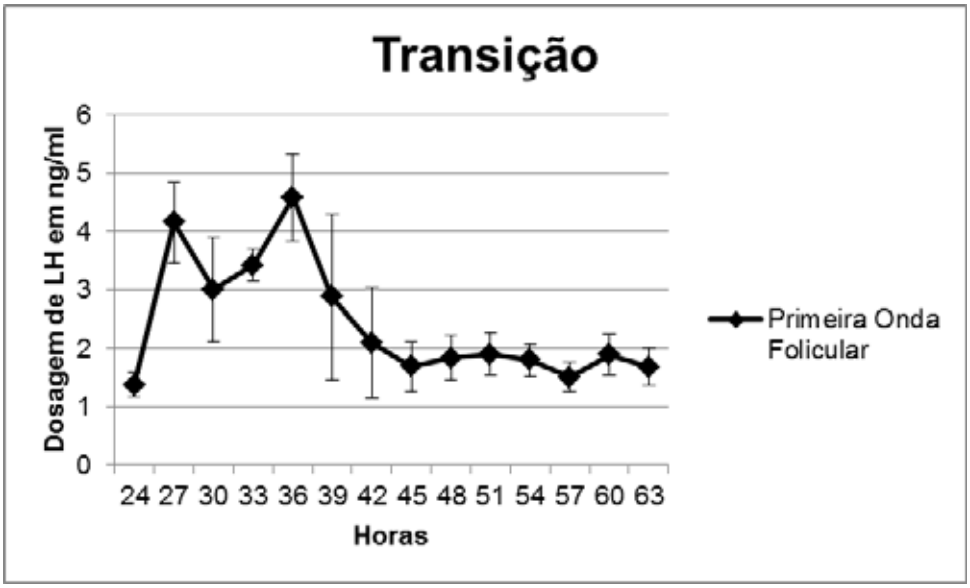

Figura 6 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular no período de transição.

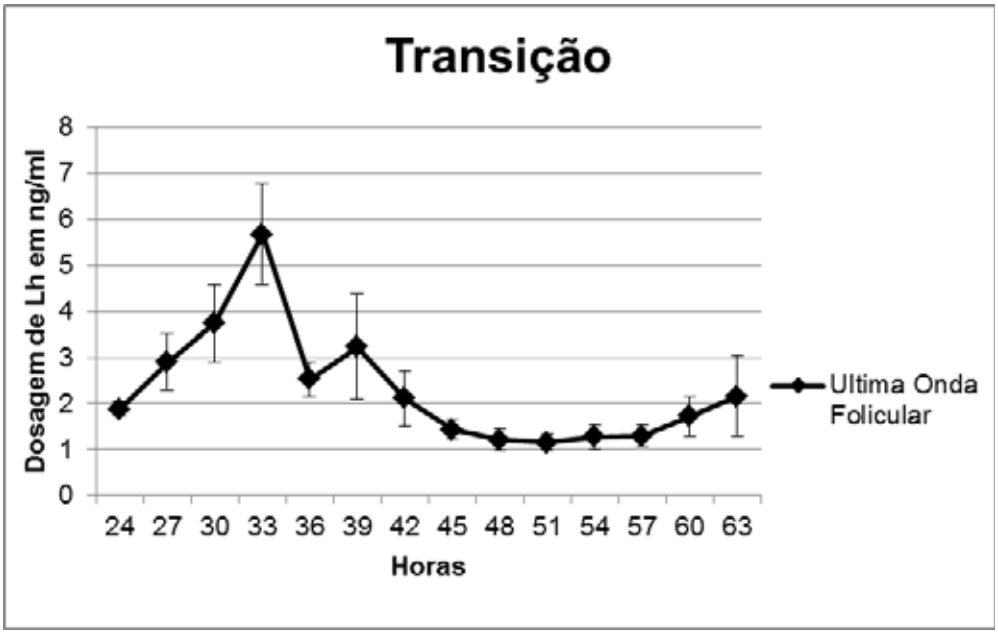

Figura 7 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da ultima onda folicular no período de transição.

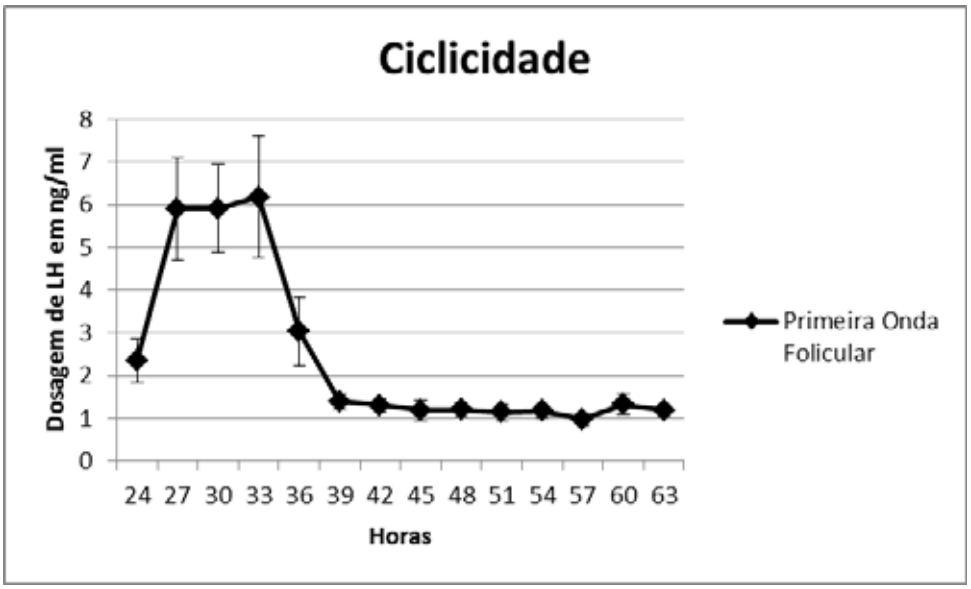

Figura 8 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da primeira onda folicular no período de ciclicidade.

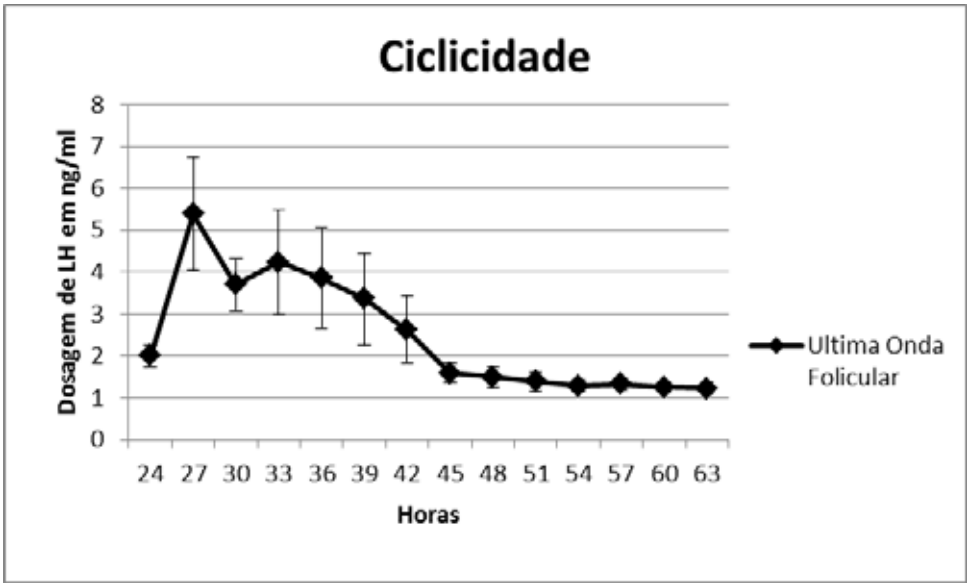

Figura 9 – Perfil sérico de Hormônio Luteinizante (LH) em ovelhas da raça Santa Inês submetidas a protocolo de superovulação iniciado próximo a emergência da ultima onda folicular no período de ciclicidade.

Conforme o observado na análise dos dados, a amplitude do pico pré-ovulatório de LH varia entre os períodos estacionais de 8,10±0,40 a 11,02±0,53 (Tabela 8), para anestro com estimulação da primeira onda folicular e ciclicidade com estimulação da ultima onda folicular, respectivamente.

Na análise do efeito do período estacional dentro de cada grupo verifica-se que para o grupo POF a amplitude do LH foi menor nos grupos de anestro e transição, comparado ao grupo de ultima onda folicular. Entretanto no período estacional de ciclicidade o grupo de POF foi de amplitude maior (P<0,05), conforme apresentado na tabela 8.

A amplitude média do pico pré-ovulatório de LH, no presente estudo, foi de 9,33±3,80 (média total).

Tabela 8 - Valores médios (±S.E.M.) da amplitude do pico pré-ovulatório de LH em ng/ml, em horas, em relação a retirada do dispositivo intravaginal – CIDR.

	Anestro		**Transição**		**Ciclicidade**	
	POF	**UOF**	**POF**	**UOF**	**POF**	**UOF**
Amplitude do pico de LH	8,10±0,40[a]	8,60±0,94[a]	8,30±0,52[a]	9,20±0,62[a]	11,02±0,53[b]	10,76±0,57[ab]

[ab]Letras diferem entre si na mesma linha (dentro de grupo, entre períodos estacionais; P<0,05);

7. DISCUSSÃO

O início do estro nos animais estimulados com FSH para superovulação na primeira e ultima onda folicular, nos diferentes períodos estacionais: anestro, transição e ciclicidade avaliado entre 12 a 24 horas após a remoção do implante de progesterona foram muito próximos, com médias entre 18,00 e 20,40 horas, diferentemente do observado por SIMONETTI et al. 2008; VEIGA-LOPEZ et al; 2008; SIDDIQUI et al; 2010, entre 18 a 42 horas, em ovelhas lanadas. Esta concentração no momento do início da manifestação do estro é um fator importante para o momento da Inseminação ou cobertura e colheita dos embriões. Auxiliando nos desafios dos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos, como no decréscimo da frequência de folículos anovulatórios ou ovulações prematuras, aumentando a eficiência dessa biotecnia e conseqüentemente permitindo o melhor momento do uso da inseminação artificial.

No período de ciclicidade, os animais superestimulados no iniciado da primeira onda folicular apresentaram maior número de ovulações (17,00) e maior taxa de ovulações que os demais tratamentos (97,9 %). Certamente por apresentarem folículos grandes (≥6mm), e com maior freqüência entre as ovelhas (Oliveira, 2011), consequentemente maior concentração de LH pré-ovulatório. Acredita-se que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório tenha interferido na resposta ao tratamento. A superestimulação com FSH iniciada na ausência de um folículo dominante tem resultado em melhores taxas de recrutamento folicular e ovulação (RUBIANES et al., 1995; 1997; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002; OLIVEIRA, 2011). No presente estudo, não garantiu em todos os animais a ausência de folículos dominantes, mesmo iniciados com tratamentos que utilizam a gonadotrofina próximo as emergências de ondas foliculares.

Embora o intervalo de tempo entre o início do estro e o pico de LH não diferiu entre os grupos em estudo e períodos estacionais, em todos os grupos, o início do estro foi seguido pelo aparecimento do pico pré-ovulatório de LH. Estudos demonstraram atraso no surgimento do pico pré-ovulatório de LH, quando no protocolo hormonal não é incluso o uso de eCG, assim deve-se levar em

consideração o tipo de protocolo utilizado, já que no programa de inseminação artificial as ovelhas que não receberam o eCG devem ser inseminadas mais tarde (SIMONETTI et al. 2008). Em todos os tratamentos, o intervalo entre o início do estro e o pico de LH foi semelhante à relatada por JABBOUR E EVANS (1991) e SIMONETTI et al. (2008).

A superestimulação da primeira onda folicular para o período de ciclicidade apresentou a melhor amplitude do pico pré-ovulatório de LH (11,02±0,53 ng/mL). Consequentemente levou a maior número médio de ovulações e aumento na taxa de ovulação. No presente experimento, as amplitudes médias dos picos de LH não apresentaram valores tão elevados. Esse fato pode ter ocorrido pela utilização de diferentes protocolos já que os mesmos foram preconizados com base em um estudo preliminar da dinâmica folicular dos animais que foram submetidos a superovulação (OLIVEIRA, 2011). Por outro lado, os valores observados indicam que tratamentos com o FSH induzem maior amplitude de LH pré-ovulatório. Essa maior amplitude no pico de LH foi observada nos animais que apresentavam ciclicidade e na primeira ou última onda folicular, condizente com o observado por OLIVEIRA, 2011.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitiram concluir que:

- A superestimulação teve influência no pico pré-ovulatório de LH, com melhores resultados para o grupo de primeira onda folicular no período de Ciclicidade.

- O momento do pico pré-ovulatório de LH não diferiu para os grupos e nem períodos estacionais.

- A amplitude do pico pré-ovulatório de LH mostrou melhores índices apenas para o grupo de primeira onda folicular no período de ciclicidade.

-O número médio e a taxa de ovulações foram melhores para o grupo de primeira onda folicular no período de ciclicidade.

9. REFÊRENCIAS

AMORIM, E.A.M.; TORRES, C.A.A.; AMORIM, L.S. et al. Dinâmica folicular em cabras da raça Toggenburg em lactação tratadas ou não com somatotropina bovida recombinante. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1500-1508, 2007.

ARAÚJO, R.C. **Produção de leite e atividade ovariana pós parto de ovelhas Santa Inês alimentadas com casca de soja em substituição ao feno "coastcross" (Cynodon SP).** 2006. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens), Programa de Pós-graduação em agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

ARMSTRONG, D.T.; PFIZER, A.P.; WARNES, G.M.; SEAMARK, R.F.. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. **Journal of reproduction and fertility.** v.67, p.403-407, 1983.

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.19, p.31-42, 1983.

BAIRD, D.T.; McNEILLY, A.S. Gonadotrophic control of follicular development and fuction during the oestrus cycle of the ewe. **Journal of reproduction and fertility.** V.30, p.119-133, 1981.

BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J. F.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination, **Theriogenology**, v. 45, p. 1553-1559, 1996.

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

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

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic study of ovarian function during early pregnancy and after parturition in the ewe. **Theriogenoloy**, v. 53, p.673-689, 2000.

BEARD, A.P.; HUNTER, M.G. Effects of exogenous oxytocin and progesterone on GnHR-induced short luteal phase in anoestrus ewes. **Journal Reproduction Fertility**, v.106, p.55-61, 1996.

BEN JEBARA, M.K.; CARRIÈRE, P.D.; PRICE, C.A. Decreased pulsatile LH secretion in heifers superovulated with eCG or FSH **. Theriogenology,** v.42, p.685-694, 1994.

BEVERS, M.M.; DIEILEMAN, S.J.; BLANKESTEIN, D.M.; VAN TOL, H.T.M.; BROEK, J. Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstondione. and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. **Journal Reproduction Fertilily**, v.87, p.745-754, 1989.

BITTMAN, E.L.; KAYNARD, A.H.; OLSTER, D.H.; ROBINSON, J.E.; YELLON, S.M.; KARSCH, F.J. Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. **Neuroendocrinology,** v.40, p.409-418, 1985.

BOLT, D.J; SCOTT, V.; KIRACOFFE, G.H. Plasma LH and FSH after estradiol norgestomet and GnRH Treatment in overiectomized beef heifers. **Animal Reproduction Science,** v.23, p.263-271, 1990.

CASTONGUAY, F.; DUFOUR, J.J.; MINVIELLE, F. et al. Follicular dynamics and dominance in Boorola X Finnish landrace and Boorola X Suffolk ewes heterozygous for the F gene. **Journal Reproduction and fertility**, v.89, p.193-203, 1990.

COGNIÉ, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology,** v.51, p.105-116, 1999.

COGNIÉ,Y.; BARIL, G.; POULIN, P.; MERMILLOD, P. Current status o embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology,** v.59, p.171–188, 2003.

COMBARNOUS, Y. Gonadotropins: structure, synthesis, functions. In: Tribault, C.; Levasseur, M.C; HUNTER, R.H.F. Reproduction mam. man. p.61-78. Paris: Ellipses, 1993.

CORDEIRO, M.F.; LIMA-VERDE, J.B.; LOPES-JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; FARIAS, L.N.; SALLES, H.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research,** v.49, p.19-23, 2003.

D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B. R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, v.51, p.9-35, 1999.

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

DRIANCOURT, M .A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 63-70, 1991.

DRIANCOURT, M .A. Lack of between-follicle interactions in the sheep ovary. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 34, p. 249-260, 1994.

EVANS, A.C.O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal reproduction science,** v.78, p.289-306, 2003.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon´s artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworths, 1987. 194 p.

EVANS, G.; ROBINSON, T. J. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus, **Journal of Agricultural Science**, v. 94, p. 69-88, 1980.

FONSECA,J.F.; TORRES, C.A; RODRIGUES, M.T.; SANTOS, A.D.F.; FÜRST, R.; PROSPERI, C.P.; MAFFILI, V.V.; ROVAY, H. Estrus, ovulation time and progesterone in Alpine and Saanen nulliparous goats synchronized with prostaglandin**. Acta Science veterinary**, v.31, p. 377, 2003.

FONSECA,J.F.; BRUSCHI, J.H.; SANTOS, A.D.F.; MAFFILI, V.V.; MORAES, E.A.; PONTES, R.A.M.; PROSPERI, C.P.; Sincronização de estro em cabras Toggenburg durante a estação de acasalamento. **Acta Science veterinary,** v.31, p.238, 2004.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, XXVI, Goiânia – GO. **Anais...Palestras,** Goiania, 2005.

FONSECA, J.F. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. **Embrapa Caprinos.** 30p. 2006.

FREITAS, V.J.E.; BARIL,G.; BOSC, M.; SAUMANDE, J. Induction and synchronization of estrus in goats: the relative efficiency of one versus two fluorogestone acetate-impregnated vaginal sponges. **Theriogenology**, v.45, p.1251-1256, 1996.

FREITAS, V.J.E.; BARIL,G.; SAUMANDE, J. Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestoment ear implants. **Animal Reproduction Science**. V.46, p.237-244, 1997.

GdeNICOLO, S.T.; MORRIS, S.T.; KENYON, P.R. et al. Induced seasonal reproductive performance in two breeds of sheep. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.278-289, 2007.

GINTHER, O.J.; ARAUJO,R.R.; PALHAO, M.P. et al. Necessity of sequencial pulses of prostaglandin F2alpha for complete physiologic leteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.641-648, 2009.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1141-1149, 1996.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Folicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology,** v.42, p.987-1001, 1994.

GODFREY, R.W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of oestrus synchronization of hair sheep in the tropics. **Animal Reproduction Science,** v.47, p.99-106, 1997.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCIA-GARCIA, R.M.; DEL CAMPO, A.; GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (Ovis gmelini musimon) and effect on the growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.265-272, 2001.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M.J.; SOUZA, C.J.H.; GROOME, N.P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; LOPEZ-SEBASTIÁN, A.; BAIRD, D.T. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. Theriogenology. v.57, p.1263-1272, 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA,R.M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M.A.; TRESGUERRES, J.H.F.; COCERO, M.J.; FLORES, J.M. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**, v.63, p.2523-2534, 2005.

GOSWAMI, J.; SARMAH, B.C.; CHAKRAVARTY, P.; SARMAH, B.K.; GOSWANI, R.N. Follicular growth in response to exogenous gonadotrophin in anoestrus goat. **Indian Veterinary Journal**, v.75,p.311-313, 1998.

GUIDO, S.I.; OLIVEIRA, M.A.L; LIMA, P.F. Eficiência do syncromate-B associado a PF_2 sobre o restabelecimento da ciclicidade de cabras Saanen em anestro lactacional. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v.23, p.51-56, 1999.

HACKETT, A.J.; ROBERTSON, H.A. Effect of dose and time of injection of prostaglandin F2α in cycling ewes. **Theriogenology**, v.13, p.347-351, 1980.

HAFEZ, E.S.E; JAINUDEEN, M.R; ROSNINA, Y. Hormonios, Fatores de crescimento e Reprodução; In: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ªed, Barueri: Manole, 2004, p.33-54.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos; In: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ªed, Barueri: Manole, 2004, p.55-67.

HEAPE, W. The sexual season of mammals. **Quarterly journal of microscopical science**. v.44, p.1-44, 1990.

HERRERA, H.L.; FELDMAN, S.D.; ZARCO, Q.L. et al. Evaluación Del efecto luteolitico de La prostaglandina F2alfa em diferentes dias Del ciclo estral de La borrega. **Veterinaria México**, v.21, p.143-147, 1990.

HOLTZ, W.; SOHNREY, B.; GERLAND, M., et al. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in gosts. **Theriogenology**, v.69, p.785-792, 2008.

HUGHES, F.; LUCAS, J.M.; NETMAN, A.B. The synchronization of oestrus and subsequent fertility in ewes following treatment with a synthetic prostaglandin analog (ONO453). **Prostaglandin**, v.11,p.1033-1039, 1976.

HUNTER, R.H. Low incidence of fertilisation in superovulated cows: a physiological explanation. **Veterinary Record**, v.123, p.443, 1988.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. **Theriogenology,** v.35, p.91–107. 1991

IIDA, K.; KOBAYASHI, N.; KOHNO, H.; MIYAMOTO; FUKUI, Y.A. A comparative study of induction estrus and ovulation by three different intravaginal devices en ewes during the non-breeding season. **Journal of Reproduction and Development,** v.50, n.01, 2004.

JABBOUR, H.N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.93-106, 1991.

KAFI, M.; McGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.137–157, 1997.

KEISLER, D. H.; KEISLER, L. W. Formation and function of GnRH-indiced subnormal corpora lútea in cyclic ewes. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p. 267-273, 1983.

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

LOI, P.; PTAK, G.; DATTENA, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; CAPPAI, P.. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. **Reproduction Nutrition Development,** v.38, p.615-628, 1998.

LOPEZ-SEBASTIÁN, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO MORENO, J; GOMEZ BRUNET, A.; TOWSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.279-291, 1997.

LOPEZ-SEBASTIÁN, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; CORRIZOSA, J.A. et al. New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. **Theriogenology**, v.68, p. 1081-1087, 2007.

LÓPEZ SEBASTIAN, A.; INSKEEP, E. K. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. **Liv. Production Science**, v.27, p.177-184, 1991.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER,W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MAUREL, M.C.; COMBARNOUS, Y. Méthode rapide de détection de l'hormone lutéinisante (LH) chez les canidés et lês ruminants. In:1eres. Journées CNVSPA-SNGVT, **Joué-les-Tours**, p. 31-34. 1994.

McCRACKEN, J.A.; SCHAMS, W.; OKULICZ, W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF-2a from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.7, p.31-55, 1984.

McCRACKEN, J.A.;CARLSON, J.C.; GLEW, M.E.; GODING, J.R.; BAIRD, D.T.; GREEN, K.; SAMUELSSON, B. Prostaglandin F2α identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nature**, v.238, p.129-134, 1972.

McNATTY, K. P.; BALL, K.; GIBB, M.; DOBSON, C.; BALL, K.; THURLEY, D. C. Induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes with exogenous GnHR. **Journal of Reproduction and Fertiity**., v. 64, p. 93-96, 1982.

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. follicular recruitment ond ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 post-ovulation in goats. **Theriogenology,** v.58, p. 1713-1721, 2002.

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

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology,** v.72, p.477–483, 2009.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology,** v.68, p.1111–1117, 2007.

MITCHELL, L. M.; DINGWALL, W. S.; MYLNE, M. J. A.; HUNTON, J.; MATTHEWS, K.; GEBBIE, F. E.; McCALLUM, G. J.; McEVOY, T. G. Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.163-174, 2002.

MONTEIRO, F.M.; MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.; CARVALHO, L.M.; SARTORELI, E.; EDERHARDT, B.G.; NOGUEIRA, G.D.E.P.; BARROS, C.M. LH surge in Nelore cows (Bos indicus), after induced estrus or after ovarian superestimulation. **Animal Reproduction Science,** v.110, p.128-138, 2009.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p.55-81, 1983.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H; GONÇALVES, P.B.D; FREITAS, V.J.F; LOPES JUNIOR, E.S. Controle do estro e da ovulação em Ruminantes; In:GOLÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**; 2ªEd, São Paulo:Roca, 2008, p.33-56.

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

NAASZ, P.E.; SLYTER, A.L.; Effect of prostaglandin F2α administration on early pregnancy in ewes. **Journal animal science**, v.64, p.1127-1133, 2007.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in post partum in cattle. **Journal of Animal Science,** v. 68, p.817-830, 1990.

OLIVEIRA, M.E.F. **Dinâmica Folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e superovulação em ovelhas Santa Inês**. 2011.101f. Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal), Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias,Jaboticabal, 2011.

ROBINSON, T.J.; QUINLIVAN, T.D.; BAXTER, C. The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. **Journal Reproduction Fertility,** v.17, p.471–83, 1968.

ROBINSON, T.J.; MOORE, N.W.; HOLST, P.F.; SMITH, J.F. The evaluation of several progestogens administered in intravaginal sponges for the synchronization of estrus in the entire cyclic Merino ewe. In: ROBINSON, T.J, editor. **Control of the ovarian cycle in the sheep. White and Bull PTY** Ltda. P,76-91, 1967.

ROMANO, J.E. Comparison of fluorogestone and medroxyprogesterone intravaginal pressaries for estrus synchronization in dairy goats. **Small Ruminants Reseach**, v.22, p.219-223, 1996.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. Theriogenology. v.43, p.465–472, 1995.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑOLES, C.; RIVERO, A.; ANDADAMS, G.P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. Theriogenology, v.47, p.1479-1488, 1997.

RUBIANES, E. Nociones basica de fisiologia reproductiva en cabras y ovejas. In: **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. Anais... São Paulo. p. 225-282, 2000a.

RUBIANES, E. Advances on ovarian physiology knowledge using transrectal ultrasonography in sheep and goat. Workshop reproduction in Small Ruminant In: **14 International Congress on Animal Reproduction**, Stockholm, p.266, 2000b.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine habeas luteum to prostaglandin F2α. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.47-55, 2003.

RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S. Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. **Theriogenology,** v. 49, p. 356-362, 1998.

RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUNN,R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal Agricultural Science**, v.72, p.451-454, 1969

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

SASA, A. **Efeitos da nutrição na atividade cíclica e reprodutiva e nas concentrações de melatonina em ovelhas mantidas em pastagens e submetidas ao efeito macho durante o anestro estacional**. 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Programa de Pós- graduação em Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 197-203, 1993.

SENTHILKUMAR, P.; RAJA SUNDARAM, R.C.; KATHIRESAN, D. Influences of different gonadotrophin treatments on the yield of transferable and non-transferable quality embryos in Malabari goats. **Indian Veterinary Journal**. v.76, p.375-378, 1999.

SILVA, A. E. F. S. & NUNES, J. F. Tempo de ovulação em cabras (sem raça definida) sincronizadas com esponjas vaginais de FGA (acetato de fluorogestona) superovuladas com PMSG (resultados preliminares**). Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.8, p.145-154 1984.

SIROIS, J.; FOURTUNE, J. E. Lengthening the bovine estrous cycles with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, p. 916-925, 1990.

SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAGMILLER, J.G.; BERARDINELLI, J.G.; CUSTEP, E.E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum anestrus beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 799-816, 1990.

SIDDIQUI, M.A.; FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; COOPER, D.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. **Reproduction, Fertility and Development,** v.22-27, p.1110-1117, 2010.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O.E.; CAROU, N.; ALBERIO, R.H.; ABECIA, J.A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes Animal. **Reproduction Science**, v.104, p.227-237, 2008.

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

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E. Processos reprodutivos na fêmea. In:SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **DUKES/Fisiologia dos animais domésticos**, 11ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 615-644.

THOMPSON, F.N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino; In: REECE, W.O. **Dukes/Fisiologia dos animais domésticos**, 12ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.645-669

URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; SOUZA, M.I.L.; LOAIZA, A.M.E. Efecto de La sincronización Del estro com prostaglandina-F2α VS CIDR+500 UI de eCG em ovejas Bergamacia durante El inicio de La fase luteal. **Revista Cientifica**, v.XVIII, p.368-373, 2008a.

URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M.I.L. Población folicular y concentraciones plamáticas de progesterona (P_4) em ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.40, p.83-88, 2008b.

VALLET, J.L.; LAMMING, G.E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and estradiol in ewes. Journal Reproduction Fertility, v.90, p. 625-634, 1990.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; GARCÍA-GARCÍA, R. M.; DOMÍNGUEZ,V.; COCERO, M. J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. **Theriogenology**, v.63, p.1973–1983, 2005.

VEIGA-LOPEZ, A.; ENCINAS, T.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. **Reproduction in Domestic Animals,** v.43, p.92–98 , 2008.

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

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

WHEELER, A.G.; LAND, R.B. Seasonal variance incoestrus and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. **Animal Production,** v.24, p.363-376, 1977.

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

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicty in suckled beef cows. A review. **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000.